

08.04.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application:

2002年 3月29日

REC'D 25 APR 2003

WIPO

PCT

出 願 番 号

Application Number:

特願2002-097280

[ST.10/C]:

[JP2002-097280]

出 願 人

Applicant(s):

科学技術振興事業団

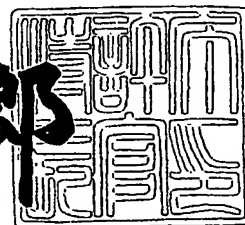
CERTIFIED COPY OF  
PRIORITY DOCUMENT

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2003年 3月14日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

太田 信一郎



出証番号 出証特2003-3016796

【書類名】 特許願

【整理番号】 P023P01

【提出日】 平成14年 3月29日

【あて先】 特許庁長官 及川 耕造 殿

【国際特許分類】 A61K 48/00  
A61K 9/51  
A61K 47/42  
A61P 35/00  
A61P 43/00  
C07K 14/02  
C07K 19/00

【発明の名称】 中空ナノ粒子を形成するタンパク質に疾患治療用の細胞  
導入物質を融合させた薬剤

【請求項の】 8

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府吹田市上山田7番C-104号

【氏名】 黒田 俊一

【発明者】

【住所又は居所】 大阪府豊能郡豊能町希望ヶ丘2-30-2

【氏名】 谷澤 克行

【発明者】

【住所又は居所】 兵庫県神戸市灘区篠原伯母野山町1-2-806

【氏名】 近藤 昭彦

【発明者】

【住所又は居所】 東京都新宿区納戸町6

【氏名】 上田 政和

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市門田文化町2-10-13

【氏名】 妹尾 昌治

【発明者】

【住所又は居所】 岡山県岡山市伊島町2-20-22-206

【氏名】 多田 宏子

【特許出願人】

【識別番号】 396020800

【氏名又は名称】 科学技術振興事業団

【代理人】

【識別番号】 100080034

【弁理士】

【氏名又は名称】 原 謙三

【電話番号】 06-6351-4384

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 003229

、【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 0111475

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 中空ナノ粒子を形成するタンパク質に疾患治療用の細胞導入物質を融合させた薬剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

特定の細胞に対する認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質からなる中空ナノ粒子において、当該タンパク質に疾患治療用の細胞導入物質が融合される薬剤。

【請求項 2】

上記タンパク質は、B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質であることを特徴とする請求項 1 記載の薬剤。

【請求項 3】

上記薬剤は、上記タンパク質をコードする遺伝子と、その下流側に上記細胞導入物質をコードする遺伝子とを含むベクターにて真核細胞を形質転換させ、当該真核細胞に遺伝子発現させることにより得られることを特徴とする請求項 1 または 2 記載の薬剤。

【請求項 4】

上記真核細胞は、動物細胞、酵母または昆虫細胞であることを特徴とする請求項 3 記載の薬剤。

【請求項 5】

肝臓疾患治療用に用いられることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 6】

上記細胞導入物質は、インターフェロンまたは肝細胞成長因子であることを特徴とする請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 7】

静脈注射により人体に投与されることを特徴とする請求項 1～6 のいずれか 1 項に記載の薬剤。

【請求項 8】



請求項1～7のいずれか1項に記載の薬剤を投与することによる疾患の治療方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、中空ナノ粒子を形成するタンパク質に疾患治療用の細胞導入物質が融合されてなる薬剤に関し、より詳細には、粒子内部に疾患治療用の細胞導入物質を包含し、この細胞導入物質を特定細胞または組織内に特異的に導入可能な薬剤に関するものである。

【0002】

【従来の技術】

近年、医学の分野において、患部に直接作用し、高い効果を示す副作用の少ない薬品の開発が盛んに行われている。特に、ドラッグデリバリーシステム（DDS）と呼ばれる方法は、目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的に薬剤等の有効成分を運搬し、目的箇所で有効成分を作用させることのできる方法として注目されている。

【0003】

目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的に薬剤となるタンパク質を送り込む方法としては、従来、当該タンパク質をコードする遺伝子が組み込まれた発現ベクターをエレクトロポレーション法等により目的細胞に導入して、この遺伝子を細胞内で発現させることによりタンパク質薬剤を細胞内に送り込むいわゆる遺伝子導入方法が開発されてきた。しかし、このような従来の遺伝子導入方法は、いずれも、目的細胞、あるいは、目的組織に対して特異的にタンパク質薬剤を送り込む方法としては不十分なものであった。他方、薬剤となるタンパク質を直接的に目的細胞、あるいは、目的組織に送り込む方法については、未だ有効な方法が開発されていないのが現状である。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】

以上のような状況に鑑み、本発明者らは、国際公開番号W001/64930

の国際出願（以下、「国際出願W001/64930」という）において、粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が導入された中空ナノ粒子を用いて、目的とする細胞や組織に、物質（遺伝子、タンパク質、化合物等）を特異的かつ安全に運搬、導入するための方法を提案しているが、この方法を応用しつつ目的細胞または組織に対して特異的に送り込むことができるタンパク質薬剤の開発等が以下のような問題を克服する上からも更なる課題となっていた。

## 【0005】

従来、タンパク質薬剤を、目的とする細胞や組織に特異的かつ安全に運搬、導入することが困難であったため、タンパク質薬剤を用いた治療は患者に大きな負担を与えていた。

## 【0006】

例えば、ウィルス性肝炎（特にC型肝炎）の治療には、静脈注射により、タンパク質薬剤であるインターフェロンを長期間全身投与する方法をとっている。この方法は、高い治療効果が認められるものの、患部以外にもインターフェロンが作用するため、~~患者に~~に高熱、脱毛、虚脱感、免疫反応などの副作用がおきるという問題を有している。

## 【0007】

また、肝細胞成長因子は肝硬変治療に有効であることが分かっているが、静脈注射で全身投与すると、予測できない副作用が起こる可能性があるので、カテーテルにより肝臓に直接投与する方法を採用している。しかし、カテーテルによる投与のためには、手術が必要であり、長期間の治療では患者に負担がかかっていた。

## 【0008】

本発明は、上記の課題に鑑みなされたものであり、その目的は、タンパク質中空ナノ粒子を用いた目的の細胞や組織に特異的に作用する疾患治療用薬剤であって、粒子内部にタンパク質薬剤を効率よく包含させることができる薬剤、およびこの薬剤を用いた治療方法を提供することにある。

## 【0009】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは、鋭意検討を重ねた結果、粒子を形成するタンパク質と、疾患治療用のタンパク質薬剤（細胞導入物質）とが融合されたタンパク質を発現するベクターを作製し、このベクターを用いて薬剤となる粒子を製造することにより、粒子内部にタンパク質薬剤を効率よく包含させることができることを見出し、本発明を完成させるに至った。

#### 【0010】

即ち、本発明に係る薬剤は、特定の細胞（たとえば肝細胞など）に対する認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質からなる中空ナノ粒子において、当該タンパク質に疾患治療用の細胞導入物質が融合されてなる薬剤である。

#### 【0011】

上記「粒子形成能を有するタンパク質」としては、たとえばB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質を挙げることができる。このタンパク質は、真核細胞で発現させると、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出される。本発明の薬剤は、このような粒子形成能を有するタンパク質をコードする遺伝子と、その下流側に上記細胞導入物質（換言すれば、タンパク質薬剤）をコードする遺伝子とを含むベクターによって真核細胞（たとえば哺乳類等の動物細胞、酵母または昆虫細胞）を形質転換させ、当該真核細胞に遺伝子発現させることにより、当該タンパク質に細胞導入物質を融合させたかたちで粒子として製造することができる。

#### 【0012】

このように、粒子を形成するタンパク質に疾患治療用の細胞導入物質が融合したかたちで粒子が形成されるので、粒子形成の際、あわせて粒子内部に細胞導入物質を包含させることができ、粒子形成後に後工程で粒子内部に細胞導入物質を導入するといった工程が不要になり、薬剤の製造が容易になる。さらに、粒子形成後に粒子内部に導入することが困難な巨大分子等でも、粒子内部に効率よく包含させることが可能になる。

#### 【0013】

上記B型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質を用いて形成された粒子は、肝細胞を認識し、肝細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することができるので、

肝臓疾患治療用の物質（タンパク質薬剤）を包含させることにより、肝細胞に対して特異的かつ効果的に作用する有効な治療薬となる。この場合、粒子内部に包含させる物質としては、たとえばインターフェロン（IFN）または肝細胞成長因子（HGF）等のタンパク質薬剤を挙げることができる。IFNは、ウイルス性肝炎の治療薬として用いられており、HGFは肝硬変に冒された肝臓を再生させる効果がある。これらを粒子内部に包含させることで、肝細胞特異的に導入することができ、有効で副作用の少ない肝炎治療または肝硬変治療を行うことができる。

## 【0014】

また、たとえば上記B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を、本来の肝細胞に対する感染能を欠失するように改変し、さらに増殖因子や抗体を提示するように改変し、このように改変されたB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を用いて粒子を形成することで、肝細胞以外の特定の細胞に対して特異的に粒子内の物質を運搬することができる。たとえば、ある癌細胞を特異的に認識する抗体を提示させることで、その癌細胞を認識し、その癌細胞に対して特異的に癌細胞に物質を運搬することができる。

## 【0015】

本発明の薬剤は、静脈注射という簡便な方法で特定の細胞または組織における疾患を効果的に治療することができ、従来の治療方法と大きく異なり、多量の薬剤の投与あるいは遺伝子治療等における外科手術を必要とせず、副作用の心配も極めて低く、そのまま臨床応用可能なものである。

## 【0016】

本発明の治療方法は、本発明の薬剤を投与することによる疾患の治療方法である。

## 【0017】

## 【発明の実施の形態】

本発明の薬剤を構成する中空ナノ粒子は、粒子形成能を有するタンパク質に細胞導入物質が融合されてなるものであるが、その粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子（換言すれば、特定の細胞を認識する分子）を導入することによ

って、目的細胞あるいは目的組織に特異的に物質を運搬することができる。このような粒子形成能を有するタンパク質としては、種々のウイルスから得られるサブウイルス粒子を適用することができる。具体的には、B型肝炎ウイルス（Hepatitis B Virus: HBV）表面抗原タンパク質等が例示される。

#### 【0018】

また、このような粒子形成能を有するタンパク質からなるタンパク質粒子としては、真核細胞でタンパク質を発現させることにより得られるものが挙げられる。つまり、真核細胞で粒子形成能を有するタンパク質を発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積され、粒子として放出されるのである。このとき、真核細胞としては、哺乳類等の動物細胞、酵母、昆虫細胞等が適用できる。

#### 【0019】

本発明者らは、後述の実施例に示すとおり、遺伝子組換え酵母で上記HBV表面抗原Lタンパク質を発現させることにより、発現されたHBV表面抗原Lタンパク質から酵母由来の脂質二重膜に多数のタンパク質が埋め込まれた短径約20nm、長径約150nmの楕円状中空粒子が形成されることを見出し、報告している（J. Biol. Chem., Vol.267, No.3, 1953-1961, 1992）。このような粒子は、HBVゲノムを全く含まないので、ウイルスとしては機能せず、人体への安全性が極めて高い。また、HBVの肝細胞への極めて高い感染力を担う肝細胞特異的レセプターを粒子表面に提示しているため、肝細胞に対して特異的に物質を運搬する運搬体としての効果も高いのである。

#### 【0020】

このように遺伝子組換え酵母を用いてタンパク質粒子を形成する方法は、菌体内の可溶性タンパク質から高効率で粒子が生産される点で好適である。

#### 【0021】

一方、昆虫細胞は、酵母よりも高等動物に近い真核細胞であるといえ、酵母では再現しきれない糖鎖等の高次構造をも再現できる点で異種タンパク質の大量生産において好ましい方法といえる。従来、昆虫細胞の系はバキュロウイルスを用いた系で、ウイルス発現を伴うものであったために、タンパク質発現に際して細

胞が死滅したり溶解したりした。その結果、タンパク質発現を連続的に行ったり、死滅細胞から遊離したプロテアーゼによりタンパク質が分解したりするという問題があった。また、タンパク質を分泌発現させる場合には、培地中に含まれる大量の牛胎仔血清が混入することで、折角培地中に分泌されても精製が困難であった。しかし、最近になって、バキュロウイルスを介さない昆虫細胞系で、無血清培養可能なものがInvitrogen社により開発され、市販されている。従って、このような昆虫細胞を用いれば、精製が容易で高次構造をも再現されたタンパク質粒子が得られる。

本発明のタンパク質中空ナノ粒子では、以上のような種々の方法によって得られた粒子表面のレセプターを任意の生体認識分子に改変することにより、肝細胞以外にも、任意の細胞及び組織に極めて高い特異性で物質を運搬、導入することが可能となる。

#### 【0022】

もちろん、粒子形成能を有するタンパク質は、上記のB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質に限定されるのではなく、粒子を形成することができるタンパク質であれば、どのようなものでもよく、動物細胞、植物細胞、ウイルス、菌類等に由来する天然タンパク質や、種々の合成タンパク質等が考慮される。また、例えばウイルス由来の抗原タンパク質等が生体内において抗体を惹起する可能性がある場合などは、改変して抗原性を減少させたものを粒子形成能を有するタンパク質として用いてもよい。例えば、粒子形成能を有するタンパク質としては、国際出願W001/64930に開示される抗原性を減少させたB型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質であってもよいし、同国際出願に開示されるその他の改変型タンパク質（B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質を、遺伝子操作技術を用いて改変したタンパク質）であってもよい。また、B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質や同タンパク質を改変した改変型タンパク質に、さらに増殖因子や抗体などの他のタンパク質を付加したものを、粒子形成能を有するタンパク質として用いてもよい。

粒子形成能を有するタンパク質に導入される生体認識分子（粒子形成能を有するタンパク質に生体認識分子が含まれる場合と、粒子形成能を有するタンパク質に

生体認識分子を融合（または直接間接に結合）させる場合とを両方含む）としては、たとえば成長因子、サイトカイン等の細胞機能調節分子、細胞表面抗原、組織特異的抗原、レセプターなどの細胞および組織を識別するための分子、ウィルスおよび微生物に由来する分子、抗体、糖鎖、脂質などが好ましく用いられる。具体的には、癌細胞に特異的に現れるEGF受容体やIL-2受容体に対する抗体やEGF、またHBVの提示するレセプターも含まれる。これらは、目的とする細胞、あるいは組織に応じて適宜選択される。なお、ここで「生体認識分子」とは、特定の細胞を認識する分子（換言すれば、特定の細胞に対する認識能を本発明の薬剤に付与する分子）のことをいう。

## 【0023】

本発明では、以上のとおりのタンパク質中空ナノ粒子を、粒子形成能を有するタンパク質に、目的細胞または目的組織に導入したい物質（細胞導入物質）を融合させたかたちで形成することによって、特定の細胞に対して特異性を有する物質運搬体を得られる。この物質運搬体に内包される細胞導入物質としては、前述のように、インターフェロン（IFN $\alpha$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\omega$ など）または肝細胞成長因子（HGF）等のタンパク質薬剤（ペプチドを含む）を挙げることができる。さらに下記表1に示す物質を挙げることができる。

## 【0024】

【表 1】

RNase等の細胞質RNA を攻撃するタンパク質	Pancreatic type Rnases from vertebrates
	RNase 1 or Bovine RNase A
	Eosinophil derived neurotoxin
	Eosinophil cationic protein
	Liver RNase (RNase 4)
	Angiogenin
	Bovine seminal RNase
	Frog Rnases (Onconase etc.)
膜透過を妨げるタンパク質	Streptolysin (Streptococcus pyogenes)
	Cholesterol binding toxins (Streptococcus, Bacillus, Clostridium, Listeria)
	alpha-Toxin (Staphylococcus aureus)
	Delta-Toxin (Staphylococcus aureus) and melittin (Apis mellifera)
	Aerolysin (Aeromonas hydrophila)
	Escherichia coli hemolysin
シグナル伝達を妨げるタンパク質	Cholera toxin (Vibrio cholerae)
	Heat-labile enterotoxins (Escherichia ColiD)
	Pertussis toxin (Bordetella pertussis)
	Exoenzyme C3 (Clostridium botulinum)
	Adenylate cyclase toxin (Bordetella sp.)
	Anthrax edema factor (Bacillus anthracis)
	Diphtheria toxin (Corynebacterium diphtheriae)
タンパク質合成を妨げるタンパク質	Pseudomonas aeruginosa exotoxin A
	Shiga toxins (Shigella dysenteriae serotype I, Escherichia coli)
	Ricin (Ricin communis)
	Ribosome-inactivating proteins
	alpha-Sarcin and related toxins (Aspergillus)
	C2 toxin (Clostridium botulinum type C and D)
細胞骨格を攪乱するタンパク質	Cytotoxic necrotizing factors (Escherichia coli)
	Enterotoxin A and cytotoxin B (Clostridium difficile)
	ActA (Listeria monocytogenes)
	IcsA (Shigella flexneri)
	Zonula occludens toxin (Vibrio cholerae)
	Pyrogenic exotoxins (superantigens) (Staphylococcus aureus and Streptococcus pyogenes)
	Anthrax lethal toxin (Bacillus anthracis)
免疫または炎症反応を抑えるタンパク質	Leukocidins and gamma lysins (Staphylococcus sp.)
	Tetanus neurotoxin (Clostridium tetani)
	VAMP-specific botulinum neurotoxins
	Botulinum neurotoxins type A and E (Clostridium botulinum)
	Botulinum neurotoxin type C (Clostridium botulinum)
	Vacuolating cytotoxin (Helicobacter pylori)
ナトリウムチャネル攪乱タンパク質	alpha-Scorpion toxins
	beta-Scorpion toxins
	Excitatory insect selective neurotoxins from scorpion venoms
	Depressant insect selective neurotoxins from scorpion venoms
	mu-Conotoxins (Conus geographus)
	mu-Agatoxins (Agelenopsis aperta)
	Anthopleurin-A, -B, and -C (anemone toxin)
	Anemone toxins (type II)
	Calitoxins



カリウムチャネル攪乱タンパク質	Kaliotoxin
	Scyllatoxin ( <i>Leiurus quinquestriatus hebraeus</i> )
	Apamin (honey bee <i>Apis mellifera</i> )
	MCD peptide (honey bee <i>Apis mellifera</i> )
	Charybdotoxin and iberiotoxin ( <i>Leiurus quinquestriatus</i> var. <i>hebraeus</i> and <i>Buthus tamulus</i> )
	Margatoxin, noxiustoxin, and kaliotoxin ( <i>Centruroides margaritatus</i> , <i>Centruroides noxius</i> , <i>Androctonus mauretanicus</i> )
	Dendrotoxins ( <i>Dendroaspis</i> species)
	Sea anemone potassium channel toxins
カルシウムチャネル攪乱タンパク質	Omega-Conotoxins ( <i>Conus</i> spp.)
	Omega-Agatoxins ( <i>Agelenopsis aperta</i> )
	Omega-Grammotoxin SIA ( <i>Grammostola spatulata</i> Chilean pink tarantula)
	Hololena toxin ( <i>Hololena curta</i> )
	PLTXII ( <i>Plectreurys tristes</i> )
	Calciseptine ( <i>Dendroaspis polylepis</i> )
	Calciclude ( <i>Dendroaspis angusticeps</i> )
	beta-Leptinotarsin-h
アセチルコリン受容体攪乱タンパク質	Taicatoxin ( <i>Oxyuranus scutellatus scutellatus</i> )
	alpha-Bungarotoxin ( <i>Bungarus multicinctus</i> )
	alpha-Cobratoxin ( <i>Naja kaouthia</i> )
	Erabutoxins ( <i>Laticauda semifasciata</i> )
	Toxin alpha (' <i>Naja nigricollis</i> ')
	kappa-Bungarotoxin ( <i>Bungarus multicinctus</i> )
	alpha-Conotoxins ( <i>Conus</i> spp.)
	Snake toxins against acetylcholine receptors
リアノジン受容体カルシウムイオンチャネル攪乱タンパク質	Muscarinic toxin from green mamba ( <i>Dendroaspis angusticeps</i> )
	Muscarinic toxin-alpha, -beta from black mamba ( <i>Dendroaspis polylepis</i> )
シナプス前攪乱タンパク質	Helothermine ( <i>Heloderma horridum horridum</i> )
	beta-Bungarotoxin ( <i>Bungarus multicinctus</i> )
	Rattlesnake venom neurotoxins: crotoxin-related proteins
	Ammodytoxins ( <i>Vipera ammodytes ammodytes</i> )
	Notexins ( <i>Notechis scutatus scutatus</i> )
	Textilotoxin ( <i>Pseudonaja textilis textilis</i> )
	Tai poxin
	alpha-Latrotoxin (black widow spider)
	alpha-Latroinsectotoxin ( <i>Latrodectus mactans tenebrosus</i> )
	Pardaxin ( <i>Pardachirus marmoratus</i> )
	Palytoxin (Corals of the spp. <i>Palythoa</i> )
	Equinatoxins ( <i>Actinia equina</i> L., sea anemone)
グルタミン酸受容体攪乱タンパク質	Conantokins ( <i>Conus</i> spp.)

【0025】

粒子形成能を有するタンパク質に細胞導入物質を融合させる方法としては、後述の実施例に示すとおり、例えば、B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質をコードする遺伝子と、その下流側に上記タンパク質薬剤をコードする遺伝子とが挿入されたプラスミドを作製し、このプラスミドを用いて真核細胞に粒子を形成させ

ることによって、粒子を形成するB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質にタンパク質薬剤が融合した本発明の薬剤を製造することができる（図1参照）。

#### 【0026】

以上のように作製された本発明の薬剤は、特定の細胞に対して特異的に薬剤を送り込むものとして有用である。例えば、本発明の薬剤として、IFNが融合したB型肝炎ウィルス表面抗原タンパク質からなる粒子を静脈注射などによって体内に投与すれば、当該粒子は体内を循環し、粒子表面に提示した肝細胞特異的レセプターにより肝細胞に導かれ、感染する。そして、IFNが肝細胞中に送られ、IFNの肝臓組織特異的な導入が行われる。なお、薬剤の投与方法としては、静脈注射による投与のほかに、経口投与、筋肉内投与、腹腔内投与、皮下投与等が挙げられる。

#### 【0027】

従来、インターフェロン、インターロイキンなどのタンパク質薬剤は、副作用が強く、全身投与を行うと患者の負担となるため、目的の細胞や組織に対してのみ特異的に薬剤を送り込むことがあった。本発明の薬剤は、上述のように、特定の細胞や組織に対して選択的に薬剤を送り込むことができるので、副作用の強い薬剤でも患者に負担をかけずに効果的に治療を行うことができる。

#### 【0028】

このように、本発明の薬剤を用いれば、*in vivo*あるいは*in vitro*で細胞、または組織に特異的に物質を導入することができ、特定細胞または組織に物質を導入することを各種疾患の治療法あるいは治療法の1ステップとして行うことも可能になるのである。

#### 【0029】

以下、添付した図面に沿って実施例を示し、この発明の実施の形態についてさらに詳しく説明する。もちろん、この発明は以下の例に限定されるものではなく、細部については様々な態様が可能であることは言うまでもない。

#### 【0030】

##### 【実施例】

以下の実施例において、HBsAgとは、B型肝炎ウィルス表面抗原（Hepati

tis B virus surface Antigen) を示す。HBsAgは、HBVの外被タンパク質であり、図2の模式図に示すように、HBsAgには、Sタンパク質、Mタンパク質、Lタンパク質の3種類がある。このうち、Sタンパク質は、3種のタンパク質に共通した、重要な外被タンパク質であり、Mタンパク質は、Sタンパク質のN末端側に55アミノ酸(pre-S2 peptide)が付加したものである。また、Lタンパク質は、Mタンパク質のN末端側に、108もしくは119アミノ酸(pre-S1 peptide)が付加したものである。

## 【0031】

HBsAg Lタンパク質のPre-S領域(pre-S1, pre-S2)は、HBVが肝細胞を認識して結合する際に、それぞれ重要な役割を担うことが知られている。Pre-S1は、肝細胞に直接結合する部位を持ち、pre-S2は、血中の重合アルブミンを介して肝細胞に結合する重合アルブミンレセプターを有するのである。

## 【0032】

肝細胞でHBsAgを発現させると、同タンパク質は、小胞体膜上に膜タンパク質として発現、蓄積される。HBsAgのLタンパク質は、分子間で凝集を起し、小胞体膜を取り込みながら、出芽様式でルーメン側に粒子として放出される。

## 【0033】

以下の実施例では、HBsAgのLタンパク質を用いた。また、図3に以下の実施例に記載されるHBsAg粒子の発現および精製操作の概略説明図を示した。

## 【0034】

(実施例A) 遺伝子組換え酵母によるHBsAg粒子の発現

本発明者らによって報告されたJ.Biol.Chem., Vol.267, No.3, 1953-1961, 1992記載の方法に基づいて、pGLDLIP39-RcTを保持した遺伝子組換え酵母(Saccharomyces Cerevisiae AH22R<sup>-</sup>株)を、合成培地High-Piおよび8S5N-P400中で培養し、HBsAg Lタンパク質粒子を発現させた。(図3a~c)  
定常成長期(約72時間後)にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical Co.製)を用いて、whole cell extractを準

備し、ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を用いて分離して、銀染色によって試料中のHBsAgの同定を行った。

#### 【0035】

これより、HBsAgは分子量約52kDaのタンパク質であることが明らかとなった。

#### 【0036】

(実施例B) HBsAg粒子の遺伝子組換え酵母からの精製

(1) 合成培地8S5N-P400で培養された遺伝子組換え酵母 (湿重量26g) をbuffer A溶液 (7.5M 尿素、0.1M リン酸ナトリウム、pH7.2、15mM EDTA、2mM PMSF、0.1% Tween80) 100mlに懸濁し、グラスビーズを用いてビードビーター (BEAD-BEATER) にて酵母を破碎した。破碎後、上清を遠心分離により回収した。(図3c、d)

(2) 次に、上清を0.75倍容の3.3% (w/w) PEG6000と混合し、30分間氷冷した。その後、遠心分離 (7000rpm、30分間) を行い、ペレットを回収した。同ペレットは、Tween80を含まないbuffer A溶液中で再懸濁した。

#### 【0037】

(3) 再懸濁した液を、10~40%の勾配をかけたCsClに重層し、28000rpm、16時間の超遠心分離を行った。遠心分離後の試料を12画分に分け、ウェスタンブロット法 (Western Blotting) (1次抗体は、anti-HBsAgモノクローナル抗体) によりHBsAgを含む画分を同定した。さらに、HBsAgを含む画分をTween80を含まないbuffer A溶液で透析した。

#### 【0038】

(4) (3) で得られた透析液 (12ml) を5~50%の勾配をかけたショ糖に重層し、28000rpm、16時間の超遠心分離を行った。遠心分離後、

(3) と同様に、HBsAgを含む画分を同定し、HBsAgを含む画分を尿素とTween80は含まず、代わりに0.85%のNaClを含むbuffer A溶液で透析した。( (2) ~ (4) : 図3e)

(5) (4) と同様の操作を繰り返し、透析後の試料をウルトラフィルター (Ultra Filter) Q2000 (アドバンテック社製) を用いて濃縮し、使用する時まで4℃にて冷蔵保存した。(図3f)

CsCl平衡遠心分離後のウェスタンブロット(3)の結果から、HBsAgは、分子量52kDaでS抗原性を有するタンパク質であることが分かった。最終的に、培地2.5L由来、湿重量26gの菌体から、約24mgの精製HBsAg粒子を得た。

#### 【0039】

一連の精製過程における画分を銀染色SDS-PAGEで解析した。また、精製により酵母由来のプロテアーゼが除去されていることを確認するために、(5)で得られたHBsAg粒子を37℃で12時間インキュベートした後、SDS-PAGEを行い、銀染色により同定を行った。

#### 【0040】

その結果、酵母由来のプロテアーゼは、一連の精製過程において完全に除去されていることが確認された。

#### 【0041】

(実施例C) HBsAgにEGFPが融合した粒子の作製

(1) EGFPとHBsAgとの融合タンパク質を発現するプラスミドの作製 (図4参照)

前述のHBsAg発現プラスミドpGLDLIIP39-RcTをXhoIおよびAccIにより切断することで、ニワトリリゾチーム分泌シグナルに融合されたHBVsAgLタンパク質をコードする遺伝子断片(以下、HBsAg遺伝子と称する)が切り出される。このとき、HBsAg遺伝子の上流側がXhoIに切断され、下流側がAccIに切断される。

#### 【0042】

一方、プラスミドpEGFP-N1(pEGFP-F(Clontech社))は、緑色蛍光タンパク質EGFPをコードする遺伝子断片を有している。このプラスミドpEGFP-N1をXhoIおよびAgeIにより切断して開裂させておく。このとき、プラスミドはEGFP遺伝子とプロモーター(CMVIE)との間で開裂し、EGFP遺伝子の上流側

がAgeIに切断され、プロモーターの下流側がXhoIに切断される。

【0043】

また、FLAG tag(NH<sub>2</sub>-YIDYKDDDDKI-COOH)は、公知のタンパク質であるが、HBsAgとEGFP融合タンパク質の間に挟むことで、抗FLAG抗体によって融合タンパク質を検出できる。FLAG tagを発現させるため、センス側が配列番号2のオリゴヌクレオチド、アンチセンス側が配列番号1のオリゴヌクレオチドを用意した。このFLAG tagをコードする合成DNAは、上流側には制限酵素AccIサイトを、下流側には制限酵素AgeIサイトを有するように設計している。

【0044】

以上のHBVsAg、FLAG tag、EGFP発現プラスミドは、T4DNAリガーゼにより、同一の制限酵素で切断された部位同士が結合される。これにより、上記HBVsAg、FLAG tagがEGFP発現プラスミドのプロモーターとEGFP遺伝子との間に挿入され、EGFPとHBsAgとの遺伝子を含むプラスミドpBOP001を構築した。この構築によりプラスミドのCMVプロモーターの下流に挿入された遺伝子は、アミノ末端にユニトリリゾチーム由来分泌シグナル、HBVsAgLタンパク質、FLAG tag、EGFPタンパク質を順に融合したタンパク質をコードする。

(2) サル腎臓由来COS-7細胞への上記プラスミドの導入とその発現

上記遺伝子の塩基配列を確認した後、上記プラスミドpBOP001をアフリカミドリサル腎臓由来COS-7細胞に遺伝子導入装置ジーンパルサー（バイオラッド）を用いて導入した。導入後、 $1 \times 10^4$ 細胞ずつ16穴ウェルプレートの各ウェルに播種し、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で10%ウシ胎仔血清を含むダルベッコ改変培地D-MEMを用いて一晚培養した。翌日、培地を無血清培地CHO-SFMII（Gibco-BRL）に置き換えて、さらに4日間培養し、COS-7細胞を含む培地を回収した。

【0045】

まず、回収した培地中に、HBsAg粒子が発現されているかを確認した。IMxキット（ダイナボット社）により、培地中のS抗原性を確認し培地中に粒子が検出された。

## 【0046】

また、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (SDS-PAGE) を行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG抗体によりタンパク質を検出すると、分子量約80 kDaのバンドが検出され、融合タンパク質が構築どおり発現していることを確認した。

## 【0047】

さらに、蛍光分光器により励起光480nmでEGFPの蛍光スペクトルを検出した。これにより発現したEGFP融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

## (3) 酵母細胞へのプラスミドの導入とその発現

さらに、上記融合タンパク質を酵母細胞で発現させるためにプラスミドpBOP001を、EGFP遺伝子の翻訳停止コドンの3'側に存在する制限酵素NotIの認識部位で切断し、大腸菌DNAポリメラーゼラージフラグメントで粘着末端を埋め平滑末端とした。ここに、T4DNAリガーゼによりXhoIリンカー5'-CCTCCGAGG-3'を挿入して平滑末端を閉環結合してプラスミドを構築した。このプラスミドから、制限酵素XhoIを用いて上記融合タンパク質をコードする部分を切り出し、プラスミドpGLDLIIP39-RcTの持つHBsAg L蛋白質遺伝子と入れ換えてプラスミドpBOP002を構築した。これを用いて、酵母 (*Saccharomyces Cerevisiae* AH22 R<sup>-</sup>株) を形質転換し、得られた遺伝子組換え酵母を、合成培地High-Piおよび8S5N-P400中で培養し、EGFPタンパク質融合HBsAg Lタンパク質を発現させた。

## 【0048】

定常成長期 (約72時間後) にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical Co.製) を用いて、whole cell extractを準備し、IMxキットによりHBsAgのS抗原性を検出した。

## 【0049】

また、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒

子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG M2抗体(Sigma)によりタンパク質を検出すると、分子量約80 kDaのバンドが検出された。

#### 【0050】

さらに、蛍光分光器により励起光480nmでEGFPの蛍光スペクトルを検出した。これにより酵母で発現したEGFP融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

#### (4) 昆虫細胞へのプラスミドの導入とその発現

次に、上記pBOP002から融合蛋白をコードする遺伝子のXhoI断片を切り出し、大腸菌由来DNAポリメラーゼラージフラグメントにより末端を平滑化し、昆虫細胞安定発現用ベクターpIZT/V5-His (Invitrogen社)のEcoRV部位へ挿入し閉環結合させた。塩基配列を確認した後、このプラスミドをpBOP003と命名した。

#### 【0051】

一方、昆虫細胞High Five株(BTI-TN-5B1-4: Invitrogen社)は、約1ヶ月かけて次第に牛胎仔血清入り培地から無血清培地(Ultimate Insect Serum-Free Medium: Invitrogen社)に馴化させておいた。次に、上記プラスミドpBOP003を遺伝子導入用脂質Insectin-Plus (Invitrogen社)を用いて無血清培地に馴化させたHigh Five株を形質転換した。その後、無血清培地で27℃48時間培養し、抗生物質zeocin (Invitrogen社)を400  $\mu$ g/mL含有する無血清培地でさらに細胞がconfluentになるまで4~7日間培養した。

#### 【0052】

1500×g、5分間遠心により培養上清を回収し、IMxキット(ダイナボット社)により、培地中のHBsAg粒子の発現測定したところ、HBsAg粒子が発現していることが確認された。さらに、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って抗FLAG M2抗体により蛋白質を検出すると、分子量約80 kDaのバンドが検出され、融合蛋白質が構築通り発現していることを確認した。さらに、蛍光分光器を用いて励起光480n



mでEGFPの蛍光スペクトルを検出した。これにより発現したEGFP融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

## 【0053】

上記EGFP融合型HBsAg Lタンパク質の遺伝子配列は配列番号13に、そのアミノ酸配列は配列番号14にそれぞれ示される。

## 【0054】

(実施例D) HBsAgにヒトインターフェロン $\omega$  (IFN $\omega$ ) が融合した粒子の作製

(1) IFN $\omega$ とHBsAgとの融合タンパク質を発現するプラスミドの作製

プラスミドpGT65-hIFN- $\alpha$ . (InvivoGen) はIFN $\omega$ をコードする遺伝子断片を有している。この遺伝子断片を鋳型としてIFN $\omega$ をコードする遺伝子断片をPCR法により常法どおり増幅した。

## 【0055】

用いた2種類のPCRプライマーは、配列番号3と3'末のオリゴヌクレオチドである。上流側にAgeIサイトを、下流側に制限酵素NotIサイトを有するように設計した。

## 【0056】

PCR産物をアガロース電気泳動で分離した後、目的のcDNAを含むバンドを回収し、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen社) を用いてpCR2.1-TOPOベクター (Invitrogen社) にサブクローニングした。挿入した塩基配列を情報 (pORF-hIFN $\alpha$  v.11製品に添付された資料) に従って確認後、制限酵素AgeIとNotIでこのcDNA断片を切り出し、前記プラスミドpEGFP-N1のAgeIとNotI部位を利用してEGFP遺伝子と入れ換えてプラスミドpBOP004を構築した。

## 【0057】

上記プラスミドpBOP004にFLAG tag遺伝子およびHBsAg遺伝子を挿入する。挿入方法は前記実施例Cの(1)に記載した方法と同様である。これにより、プラスミドpBOP005を構築した。この構築によりプラスミドのCMVプロモーターの下流に挿入された遺伝子は、アミノ末端側からニワトリリゾチーム由来分泌

シグナル、HBV s Ag Lタンパク質、FLAG tag、IFN $\omega$ を順に融合したタンパク質をコードする。

## (2) サル腎臓由来COS-7細胞への上記プラスミドの導入とその発現

上記遺伝子の塩基配列を確認した後、上記プラスミドpBOP005をアフリカミドリサル腎臓由来COS-7細胞に遺伝子導入装置ジーンパルサー（バイオラッド）を用いて導入した。導入後10%子牛胎児血清を含むダルベッコ改変培地を用いて一晚培養した。翌日、培地を無血清培地CHO-SFMII（Gibco-BRL）に置き換えて、さらに4日間培養し、COS-7細胞を含む培地を回収した。

### 【0058】

培地中のS抗原性をIMxキット（ダイナボット社）により確認し、培地中に粒子が検出された。また、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG M2抗体によりタンパク質を検出すると、分子量約70kDaのバンドが検出され、融合タンパク質が構築どおり発現していることを確認した。これにより発現したIFN $\omega$ 融合型HB s Ag Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

## (3) 酵母細胞へのプラスミドの導入とその発現

さらに、上記融合タンパク質を酵母細胞で発現させるためにプラスミドpBOP005を、IFN $\omega$ 遺伝子の翻訳停止コドンの3'側に存在する制限酵素NotIの認識部位で切断し、大腸菌DNAポリメラーゼラージフラグメントで粘着末端を埋め平滑末端とした。ここに、T4DNAリガーゼによりXhoIリンカー5'-CCTCCGAGG-3'を挿入して平滑末端を閉環結合してプラスミドを構築した。このプラスミドから、制限酵素XhoIを用いて上記融合タンパク質をコードする部分を切り出し、プラスミドpGLDLIIP39-RcTの持つHB s Ag L蛋白質遺伝子と入れ換えてプラスミドpBOP006を構築した。これを用いて、酵母（*Saccharomyces Cerevisiae* AH22R<sup>-</sup>株）を形質転換し、得られた遺伝子組換え酵母を、合成培地High-Piおよび8S5N-P400中で培養し、IFN $\omega$ タンパク質融合型HB s Ag Lタンパク質を発現させた。

## 【0059】

定常成長期（約72時間後）にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical Co.製) を用いて、whole cell extractを準備し、IMxキットによりS抗原性を検出した。また、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG M2抗体(Sigma)により試料中の融合タンパク質を検出すると、分子量約70kDaのバンドが検出された。これにより、酵母で発現したヒトインターフェロンの融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

## (4) 昆虫細胞へのプラスミドの導入とその発現

次に、上記pBOP006から融合蛋白をコードする遺伝子のXhoI断片を切り出し、大腸菌由来DNAポリメラーゼラージフラグメントにより末端を平滑化し、昆虫細胞安定発現用ベクターpIZT/V5-His (Invitrogen社) のEcoRV部位へ挿入し融合蛋白を作製した。塩基配列を確認した後、このプラスミドをpBOP007と命名した。

## 【0060】

一方、昆虫細胞High Five株 (BTI-TN-5B1-4: Invitrogen社) は、約1ヶ月かけて次第に牛胎仔血清入り培地から無血清培地 (Ultimate Insect Serum-Free Medium: Invitrogen社) に馴化させておいた。次に、上記プラスミドpBOP007を遺伝子導入用脂質Insectin-Plus (Invitrogen社) を用いて無血清培地に馴化させたHigh Five株を形質転換した。その後、無血清培地で27℃48時間培養し、抗生物質zeocin (Invitrogen社) を400  $\mu$ g/mL含有する無血清培地でさらに細胞がconfluentになるまで4~7日間培養した。

## 【0061】

1500×g、5分間遠心により培養上清を回収し、IMxキット (ダイナボット社) により、培地中のHBsAg粒子の発現測定したところ、HBsAg粒子が発現していることが確認された。さらに、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し沈降した蛋白質に対してSDS-

PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って抗FLAG M2抗体により蛋白質を検出すると、分子量約70 kDaのバンドが検出され、融合蛋白質が構築通り発現していることを確認した。これにより発現したヒトインターフェロンの融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

## 【0062】

上記ヒトインターフェロンの融合型HBsAg Lタンパク質の遺伝子配列は配列番号15に、そのアミノ酸配列は配列番号16にそれぞれ示される。

## 【0063】

(実施例E) HBsAgにヒトインターフェロン $\beta$ 1 (IFN $\beta$ 1) が融合した粒子の作製

(1) IFN $\beta$ 1とHBsAgとの融合タンパク質を発現するプラスミドの作製  
プラスミドpCMV (Hu beta) はIFN $\beta$ 1をコードする遺伝子断片を有している。この遺伝子断片を鋳型としてIFN $\beta$ 1をコードする遺伝子断片をPCR法により常法どおり増幅した。

## 【0064】

用いた2種類のPCRプライマーは、センス側が配列番号5のオリゴヌクレオチド、アンチセンス側が配列番号6のオリゴヌクレオチドである。上流側には制限酵素AgeIサイトを、下流側には制限酵素NotIサイトを有するように設計した。

## 【0065】

PCR産物をアガロース電気泳動で分離した後、目的のcDNAを含むバンドを回収し、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen社) を用いてpCR2.1-TOPOベクター (Invitrogen社) にサブクローニングした。挿入した塩基配列を情報 (GenBank accession no. M28622) に従って確認後、制限酵素AgeIとNotIでこのcDNA断片を切り出し、前記プラスミドpEGFP-N1のAgeIとNotI部位を利用してEGFP遺伝子と入れ換えてプラスミドを構築した。

## 【0066】

上記プラスミドにFLAG tag遺伝子およびHBsAg遺伝子を挿入する。挿入方法は前記実施例Cの(1)に記載した方法と同様である。これにより、プラスミ

ドpBOP008を構築した。この構築によりプラスミドのCMVプロモーターの下流に挿入された遺伝子は、アミノ末端側からニワトリリゾチーム由来分泌シグナル、HBV s Ag Lタンパク質、FLAG tag、IFN  $\beta$  1を順に融合したタンパク質をコードする。

### (2) サル腎臓由来COS-7細胞への上記プラスミドの導入とその発現

上記遺伝子の塩基配列を確認した後、上記プラスミドpBOP008をアフリカミドリサル腎臓由来COS-7細胞に遺伝子導入装置ジーンパルサー（バイオラッド）を用いて導入した。導入後10%子牛胎児血清を含むダルベッコ改変培地を用いて一晚培養した。翌日、培地を無血清培地CHO-SFMII（Gibco-BRL）に置き換えて、さらに1週間培養し、COS-7細胞を含む培地を回収した。

#### 【0067】

培地中のS抗原性をIMxキット（ダイナボット社）により確認し、培地中に粒子が検出された。また、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG抗体によりタンパク質を検出すると、分子量約70 kDaのバンドが検出され、融合タンパク質が構築どおり発現していることを確認した。これにより発現したIFN  $\beta$  1融合型HB s Ag Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

### (3) 酵母細胞へのプラスミドの導入とその発現

さらに、上記融合タンパク質を酵母細胞で発現させるためにプラスミドpBOP008を、IFN  $\beta$  1遺伝子の翻訳停止コドンの3'側に存在する制限酵素NotIの認識部位で切断し、大腸菌DNAポリメラーゼラージフラグメントで粘着末端を埋め平滑末端とした。ここに、T4DNAリガーゼによりXhoIリンカー5'-CCTCCGAGG-3'を挿入して平滑末端を閉環結合してプラスミドを構築した。このプラスミドから、制限酵素XhoIを用いて上記融合タンパク質をコードする部分を切り出し、プラスミドpGLDLIIP39-RcTの持つHB s Ag L蛋白質遺伝子と入れ換えてプラスミドpBOP009を構築した。これを用いて、酵母（*Saccharomyces Cerevisiae* AH22R<sup>-</sup>株）を形質転換し、得られた遺伝子組換え酵母を、合成培地High-Piお

よび8S5N-P400中で培養し、IFN $\beta$ 1タンパク質融合型HBsAg Lタンパク質を発現させた。

#### 【0068】

定常成長期（約72時間後）にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent (Pierce Chemical Co.製) を用いて、whole cell extractを準備し、IMxキットによりS抗原性を検出した。また、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG M2抗体(Sigma)により試料中の融合タンパク質を検出すると、分子量約70kDaのバンドが検出された。これにより、酵母で発現したヒトインターフェロン $\beta$ 1融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

#### （4）昆虫細胞へのプラスミドの導入とその発現

次に、上記pBOP009から融合蛋白をコードする遺伝子のXhoI断片を切り出し、大腸菌由来DNAポリメラーゼラージにより末端を平滑化し、昆虫細胞安定発現用ベクターpIZT/V5-His (Invitrogen社) のEcoRV部位へ挿入し閉環結合させた。塩基配列を確認した後、このプラスミドをpBOP010と命名した。

#### 【0069】

一方、昆虫細胞High Five株 (BTI-TN-5B1-4: Invitrogen社) は、約1ヶ月かけて次第に牛胎仔血清入り培地から無血清培地 (Ultimate Insect Serum-Free Medium: Invitrogen社) に馴化させておいた。次に、上記プラスミドpBOP010を遺伝子導入用脂質Insectin-Plus (Invitrogen社) を用いて無血清培地に馴化させたHigh Five株を形質転換した。その後、無血清培地で27℃48時間培養し、抗生物質zeocin (Invitrogen社) を400  $\mu$ g/mL含有する無血清培地でさらに細胞がconfluentになるまで4～7日間培養した。

#### 【0070】

1500×g、5分間遠心により培養上清を回収し、IMxキット (ダイナボット社) により、培地中のHBsAg粒子の発現測定したところ、HBsAg粒子が発

現していることが確認された。さらに、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って抗FLAG M2抗体により蛋白質を検出すると、分子量約70 kDaのバンドが検出され、融合蛋白質が構築通り発現していることを確認した。これにより発現したヒトインターフェロン $\beta$ 1融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

## 【0071】

上記ヒトインターフェロン $\beta$ 1融合型HBsAg Lタンパク質の遺伝子配列は配列番号17に、そのアミノ酸配列は配列番号18にそれぞれ示される。

## 【0072】

(実施例F) HBsAgにヒト肝細胞成長因子(HGF)が融合した粒子の作製

(1) HGFとHBsAgとの融合タンパク質を発現するプラスミドの作製

ヒト肝臓(Invitrogen社)から、Oligo-dTプライマーを用いて逆転写酵素スーパースク립トII (Gibco-BRL) によりcDNAを合成した。得られたcDNAを、HGF遺伝子を特異的に増幅する配列番号7および配列番号8のオリゴヌクレオチドをプライマーとして用いてPCRを行うことにより、約2.2 kbpのHGF遺伝子を増幅した。このとき、プライマーは、増幅されたHGF遺伝子が、上流側にAgeIサイトを、下流側に制限酵素NotIサイトを有するように設計した。

## 【0073】

PCR産物をアガロース電気泳動で分離した後、目的のcDNAを含むバンド(約2.2 kbp)を回収し、TOPO TA Cloning kit (Invitrogen社)を用いてPCR2.1-TOPOベクター(Invitrogen社)にサブクローニングした。

## 【0074】

次に、プラスミドの構築を行いやすくするため、HGF遺伝子中に存在する2箇所の制限酵素認識部位を改変した。その手順を以下に示す。

## 【0075】

二組の相補的な合成DNA、配列番号9のオリゴヌクレオチドとその相補配列である配列番号10のオリゴヌクレオチド、および配列番号11のオリゴヌクレオチドとその相補配列である配列番号12のオリゴヌクレオチドを用いて、QuickChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene社) により上記プラスミドDNAのPCRを行った。

#### 【0076】

まず、最初の一組のプライマーにより、耐熱性DNAポリメラーゼとしてPfu DNA polymerase (Stratagene) を用いて、PCRを行った。PCRは、95℃30秒間の変性、55℃1分間のアニーリング、68℃30分間の合成反応を30回繰り返して行った。その後、PCR産物を制限酵素Dpn Iで処理して、大腸菌DH5αを形質転換した。そして、形質転換した大腸菌DH5αを培養し、出現コロニーからベクターDNAを抽出し、塩基配列を確認して、変異導入されたプラスミドを選抜した。次に、得られたプラスミドを鋳型として二組目のプライマーを用いて同様の操作を行った。その結果HGF cDNAにコードされるアミノ酸を変更することなく2ヶ所のXhoI認識部位が消去されたヒトHGF cDNAを保持するプラスミドpBOP011が得られた。

#### 【0077】

塩基配列をGenBankの情報 (GenBank accession no. M29145) により確認した後、制限酵素AgeIおよびNotIでこのcDNA断片を切り出し、前記プラスミドpEGFP-N1のAgeIとNotI部位を利用してEGFP遺伝子と入れ換えてプラスミドを構築した。

#### 【0078】

上記プラスミドにFLAG tag遺伝子およびHBsAg遺伝子を挿入する。挿入方法は前記実施例Cの(1)に記載した方法と同様である。これにより、プラスミドpBOP012を構築した。この構築によりプラスミドのCMVプロモーターの下流に挿入された遺伝子は、アミノ末端側からニワトリリゾチーム由来分泌シグナル、HBsAg Lタンパク質、FLAG tag、ヒトHGFを順に融合したタンパク質をコードする。

(2) サル腎臓由来COS-7細胞への上記プラスミドの導入とその発現

上記遺伝子の塩基配列を確認した後、上記プラスミドpBOP012をアフリカミド



リサル腎臓由来COS-7細胞に遺伝子導入装置ジーンパルサー（バイオラッド）を用いて導入した。導入後10%子牛胎児血清を含むダルベッコ改変培地を用いて一晚培養した。翌日、培地を無血清培地CHO-SFMII（Gibco-BRL）に置き換えて、さらに4日間培養し、COS-7細胞を含む培地を回収した。

## 【0079】

培地中のS抗原性をIMxキット（ダイナボット社）により確認し、培地中に粒子が検出された。また、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG M2抗体によりタンパク質を検出すると、分子量約125kDaのバンドが検出され、融合タンパク質が構築どおり発現していることを確認した。これにより発現したヒトHGF融合型HBsAgLタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

### （3）酵母細胞へのプラスミドの導入とその発現

さらに、上記融合タンパク質を酵母細胞で発現させるためにpBOP012を、HGF遺伝子の翻訳停止コドンの3'側に存在する制限酵素NotIの認識部位で切断し、大腸菌DNAポリメラーゼラージフラグメントで粘着末端を埋め平滑末端とした。ここに、T4DNAリガーゼによりXhoIリンカー5'-CCTCCGAGG-3'を挿入して平滑末端を閉環結合してプラスミドを構築した。このプラスミドから、制限酵素XhoIを用いて上記融合タンパク質をコードする部分を切り出し、プラスミドpGLDLIIP39-RcTの持つHBsAgL蛋白質遺伝子と入れ換えてプラスミドpBOP013を構築した。これを用いて、酵母（*Saccharomyces Cerevisiae* AH22R<sup>-</sup>株）を形質転換し、得られた遺伝子組換え酵母を、合成培地High-Piおよび8S5N-P400中で培養し、ヒトHGFタンパク質融合型HBsAgLタンパク質を発現させた。

## 【0080】

定常成長期（約72時間後）にある遺伝子組換え酵母から、Yeast Protein Extraction Reagent（Pierce Chemical Co.製）を用いて、whole cell extractを準備し、IMxキットによりHBsAgLタンパク質のS抗原性を検出した。ま

た、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し、沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って、抗FLAG M2抗体(Sigma)により試料中の融合タンパク質を検出すると、分子量約125 kDaのバンドが検出された。これにより、酵母で発現したヒトHGF融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持したまま粒子を形成していることを確認した。

#### (4) 昆虫細胞へのプラスミドの導入とその発現

次に、上記pBOP013から融合蛋白をコードする遺伝子のXhoI断片を切り出し、大腸菌由来DNAポリメラーゼラージフラグメントにより末端を平滑化し、昆虫細胞安定発現用ベクターpIZT/V5-His (Invitrogen社)のEcoRV部位へ挿入し閉環結合させた。塩基配列を確認した後、このプラスミドをpBOP014と命名した。

#### 【0081】

一方、昆虫細胞High Five株(BTI-TN-5B1<sub>10</sub>, Invitrogen社)は、約1ヶ月かけて次第に牛胎仔血清入り培地から無血清培地(Ultimate Insect Serum-Free Medium: Invitrogen社)に馴化させておいた。次に、上記プラスミドpBOP014を遺伝子導入用脂質Insectin-Plus (Invitrogen社)を用いて無血清培地に馴化させたHigh Five株を形質転換した。その後、無血清培地で27℃48時間培養し、抗生物質zeocin (Invitrogen社)を400 µg/mL含有する無血清培地でさらに細胞がconfluentになるまで4~7日間培養した。

#### 【0082】

1500×g、5分間遠心により培養上清を回収し、IMxキット(ダイナボット社)により、培地中のHBsAg Lタンパク質粒子の発現測定したところ、HBsAg Lタンパク質粒子が発現していることが確認された。さらに、IMxのアガロースビーズに固定された一次抗体を用いて、培地中の粒子を免疫沈降し沈降した蛋白質に対してSDS-PAGEを行ったあと、ウェスタンブロッティングを行って抗FLAG M2抗体により蛋白質を検出すると、分子量約125 kDaのバンドが検出され、融合蛋白質が構築通り発現していることを確認した。これにより発現したヒトHGF融合型HBsAg Lタンパク質がそれぞれの構造を維持した

まま粒子を形成していることを確認した。

【0083】

上記ヒトHGF融合型HBsAgLタンパク質の遺伝子配列は配列番号19に、そのアミノ酸配列は配列番号20にそれぞれ示される。

【0084】

(実施例G) ヒト肝癌細胞HepG2におけるHBsAgLタンパク質粒子によるGFPの導入

指数増殖期にあるヒト肝癌細胞HepG2を $1 \times 10^5$  cells/wellになるように、3.5cmガラス底皿シャーレに植菌し、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で10%ウシ胎児血清を含むD-MEMを用いて一晚培養した。翌日、実施例Cで使用したHBsAgLタンパク質にEGFPが融合した粒子を10μg/wellになるように添加し、37℃、5%CO<sub>2</sub>存在下で6時間培養した。

【0085】

また、陰性対照として、ヒト扁平上皮癌由来細胞A431 (JCRB9009) についても同様の操作を行った。

【0086】

HepG2とA431において、細胞内でのGFPの発現の様子を共焦点レーザー蛍光顕微鏡にて観察した。

【0087】

これにより、ヒト肝癌細胞HepG2にGFPに由来する蛍光を認めた(図5)。しかし、ヒト扁平上皮癌由来細胞A431には蛍光を認めなかった(図6)。

【0088】

以上より、HBsAgLタンパク質粒子を用いることにより、ヒト肝細胞に対して極めて高い特異性と効率でタンパク質が構造を維持したまま導入されることが示された。したがって、この発明の物質運搬体は、極めて有効であることが確認された。

【0089】

(実施例H) ヒト肝癌を移植したヌードマウスに対するHBsAgLタンパク質粒子による物質導入

胆癌マウスは、ヌードマウス（系統：BALB/c nu/nu、微生物学的品質：SPF、性別：オス5週齢）の両側背部皮下に、ヒト肝癌由来細胞HuH-7（JCRB 0403）を $1 \times 10^7$ 細胞皮下に注射し、移植腫瘍が直径2 cm程度の固形癌になるまで2～4週間生育させて得た。

#### 【0090】

また、陰性対照として、ヒト大腸癌由来細胞WiDr（ATCC CCL-218）についても、同様にヌードマウスに移植した。

#### 【0091】

それぞれのマウスに、実施例CのHBsAg Lタンパク質にEGFPが融合した粒子50  $\mu$ gを、腹腔内に26 G注射針を使用して投与した。投与後12時間後にマウスを屠殺し、腫瘍部、肝臓、脾臓、腎臓、腸管を摘出し、EGFP用樹脂包埋キット（Technovit7100）を用いて組織を固定・包埋した。

#### 【0092】

具体的には、固定は4%中和ホルムアルデヒドに浸漬して行い、脱水は70% EtOHで室温2時間、96% EtOHで室温2時間、100% EtOHで室温1時間、予備浸漬は100% EtOH/Technovit7100等量混合液で室温2時間行った。その後、Technovit7100で室温24時間以内の浸漬を行い、取り出した後、室温で1時間および37℃で1時間静置して重合反応させた。

#### 【0093】

常法に従って、切片を作製し、同時にヘマトキシンエオリン染色（一般的な組織染色）を行って、蛍光顕微鏡によりHBsAg Lタンパク質粒子投与群と非投与群のEGFPによる蛍光を比較した。

#### 【0094】

これにより、ヒト肝癌由来HuH-7細胞による胆癌マウスの腫瘍部にEGFPに由来する蛍光を認めた（図7）。しかし、同マウスより同時に摘出した肝臓、脾臓、腎臓、腸管には蛍光を認めなかった。さらに、ヒト大腸癌由来WiDr細胞による胆癌マウスの腫瘍、肝臓、脾臓、腎臓、腸管にも蛍光を認めなかった（腫瘍部：図8）。

#### 【0095】

以上より、HBsAgLタンパク質粒子を用いることにより、実験動物レベルでも、ヒト肝細胞に対して極めて高い特異性と効率でタンパク質が構造を維持したまま導入されることが示された。したがって、この発明の物質運搬体は、極めて有効であることが確認された。

【0096】

【発明の効果】

以上のように、本発明に係る薬剤は、静脈注射などといった簡便な方法で、特定の細胞または組織に対して選択的かつ効率的に疾患治療用の細胞導入物質を送り込むことができるので、従来の遺伝子治療と大きく異なり、外科手術を必要とせず、副作用の心配もきわめて低く、そのまま臨床応用可能なものである。

【0097】

また、粒子を形成するタンパク質に細胞導入物質が融合したかたちで粒子を形成することにより、粒子形成の際、あわせて粒子内部に細胞導入物質を包含させることができ、薬剤の製造を容易にできる。

【0098】

【配列表】

#### SEQUENCE LISTING

<110> Japan Science and Technology Corporation

<120> Therapeutic drug contains drug components expressed and fused with proteins composing nano-particles

<130> P023P01

<160> 20

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 36

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Sequence

<400> 1

ccggtatctt atcgctgtca tccttgtaat caatat

36

<210> 2

<211> 34

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Sequence

<400> 2

atatattgat tacaaggatg acgacgataa gata

34

<210> 3

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 3

ataccggtgg gctgtgatct gcctcaga

28

<210> 4

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 4

atgcggccgc tcaagatgag cccaggtc

28

<210> 5

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 5

gaaccggtga gctacaactt gcttggatt

29

<210> 6

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 6

atgcggccgc tcagtttcgg aggtaacctg

30

<210> 7

<211> 28

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence



<400> 7

gcaccggtac aaaggaaaag aagaaata

28

<210> 8

<211> 29

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 8

ttgcggccgc tatgactgtg gtaccttat

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 9

ctgtcgaaat ccacgagggg aagaa

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 10

ttcttccct cgtggatttc gacag

25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 11

tttcccttct cgtgacttga aagat

25

<210> 12

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:Artificially  
Synthesized Primer Sequence

<400> 12

atctttcaag tcacgagaag ggaaa

25

<210> 13

<211> 2013

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (23)..(1999)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:GFP gene fused with HBsAg L pro  
tein gene

<400> 13

ctcgaggtcg agtataaaaa ca atg aga tct ttg ttg atc ttg gtt ttg tgt 52

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys

1

5

10

ttc ttg cca ttg gct gct ttg ggt aag gtt cga caa ggc atg ggg acg 100  
Phe Leu Pro Leu Ala Ala Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr

15

20

25

aat ctt tct gtt ccc aat cct ctg gga ttc ttt ccc gat cac cag ttg 148  
Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu

30

35

40

gac cct gcg ttc gga gcc aac tca aac aat cca gat tgg gac ttc aac 196  
Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn

45

50

55

ccc aac aag gat caa tgg cca gag gca aat cag gta gga gcg gga gca 244  
Pro Leu Lys Asp Gln Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala

65

70

ttc ggg cca ggg ttc acc cca cca cac ggc ggt ctt ttg ggg tgg agc 292  
Phe Gly Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser

75

80

85

90

cct cag gct cag ggc ata ttg aca aca gtg cca gca gca cct cct cct 340  
Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro

95

100

105

gcc tcc acc aat cgg cag tca gga aga cag cct act ccc atc tct cca 388  
Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro

110

115

120

cct cta aga gac agt cat cct cag gcc atg cag tgg aat tcc aca aca 436

Pro Leu Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr  
 125 130 135

ttc cac caa gct ctg cta gat ccc aga gtg agg ggc cta tat ttt cct 484  
 Phe His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro  
 140 145 150

gct ggt ggc tcc agt tcc gga aca gta aac cct gtt ccg act act gcc 532  
 Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala  
 155 160 165 170

tca ccc ata tct ggg gac cct gca ccg aac atg gag aac aca aca tca 580  
 Ser Pro Ile Ser Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser  
 175 180 185

gga ttc cta gga ccc ctg ctc gtg tta cag gcg ggg ttt ttc ttg ttg 628  
 Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu  
 190 195 200

aca aga atc ctc aca ata cca cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct 676  
 Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser  
 205 210 215

ctc aat ttt cta ggg gga gca ccc acg tgt cct ggc caa aat tcg cag 724  
 Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln  
 220 225 230

tcc cca acc tcc aat cac tca cca acc tct tgt cct cca att tgt cct 772  
 Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro

235

240

245

250

ggc tat cgc tgg atg tgt ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc 820

Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile

255

260

265

ctg ctg cta tgc ctc atc ttc ttg ttg gtt ctt ctg gac tac caa ggt 868

Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly

270

275

280

atg ttg ccc gtt tgt cct cta ctt cca gga aca tca acc acc agc acg 916

Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr

285

290

295

ggg cca tgc aag acc tgc acg att cct gct caa ggc atg ttt 964

Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe

300

305

310

ccc tct tgt tgc tgt aca aaa cct tcg gac gga aac tgc act tgt att 1012

Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile

315

320

325

330

ccc atc cca tca tcc tgg gct ttc gca aga ttc cta tgg gag tgg gcc 1060

Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala

335

340

345

tca gtc cgt ttc tcc tgg ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg 1108

Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp

350

355

360

ttc gta ggg ctt tcc ccc act gtt tgg ctt tca gtt ata tgg atg atg 1156

Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met

365

370

375

tgg tat tgg ggg cca agt ctg tac aac atc ttg agt ccc ttt tta cct 1204

Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro

380

385

390

cta tta cca att ttc ttt tgt ctt tgg gta tat att gat tac aag gat 1252

Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp

395

400

405

410

gac gac gat aag ata ccg gtc gtc acc atg gtg agc aag ggc gag gag 1300

Asp Asp Asp Lys Ile Pro Val Ser Met Val Ser Lys Gly Glu Glu

415

420

425

ctg ttc acc ggg gtg gtg ccc atc ctg gtc gag ctg gac ggc gac gta 1348

Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val

430

435

440

aac ggc cac aag ttc agc gtg tcc ggc gag ggc gag ggc gat gcc acc 1396

Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr

445

450

455

tac ggc aag ctg acc ctg aag ttc atc tgc acc acc ggc aag ctg ccc 1444

Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro

460

465

470

gtg ccc tgg ccc acc ctc gtg acc acc ctg acc tac ggc gtg cag tgc 1492

Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys

475 480 485 490

ttc agc cgc tac ccc gac cac atg aag cag cac gac ttc ttc aag tcc 1540

Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser

495 500 505

gcc atg ccc gaa ggc tac gtc cag gag cgc acc atc ttc ttc aag gac 1588

Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp

510 515 520

gac ggc aac tac aag acc cgc gcc gag gtg aag ttc gag ggc gac acc 1636

Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr

530 535

ctg gtg aac cgc atc gag ctg aag ggc atc gac ttc aag gag gac ggc 1684

Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly

540 545 550

aac atc ctg ggg cac aag ctg gag tac aac tac aac agc cac aac gtc 1732

Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val

555 560 565 570

tat atc atg gcc gac aag cag aag aac ggc atc aag gtg aac ttc aag 1780

Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys

575 580 585

atc cgc cac aac atc gag gac ggc agc gtg cag ctc gcc gac cac tac 1828



Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr  
 590 595 600

cag cag aac acc ccc atc ggc gac ggc ccc gtg ctg ctg ccc gac aac 1876  
 Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn  
 605 610 615

cac tac ctg agc acc cag tcc gcc ctg agc aaa gac ccc aac gag aag 1924  
 His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys  
 620 625 630

cgc gat cac atg gtc ctg ctg gag ttc gtg acc gcc gcc ggg atc act 1972  
 Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr  
 635 640 645 650

ctc ggc atg gac gag ctg tac aag taa agcggcccct cgag 2013  
 Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys  
 655

<210> 14

<211> 658

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:GFP protein fused with HBsAg L  
 protein

<400> 14

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn  
 20 25 30  
 Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala  
 35 40 45  
 Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp  
 50 55 60  
 Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr  
 65 70 75 80  
 Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile  
 85 90 95  
 Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln  
 100 105  
 Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Ser His  
 115 120 125  
 Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu  
 130 135 140  
 Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp  
 165 170 175  
 Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu  
 180 185 190  
 Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile  
 195 200 205  
 Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly  
 210 215 220  
 Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His

225                      230                      235                      240  
 Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys  
                          245                      250                      255  
 Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile  
                          260                      265                      270  
 Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro  
                          275                      280                      285  
 Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys  
                          290                      295                      300  
 Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr  
 305                      310                      315                      320  
 Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp  
                          325                      330                      335  
 Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp  
                          340                      345                      350  
 Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro  
                          355                      360                      365  
 Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser  
                          370                      375                      380  
 Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe  
 385                      390                      395                      400  
 Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ile Pro  
                          405                      410                      415  
 Val Ala Thr Met Val Ser Lys Gly Glu Glu Leu Phe Thr Gly Val Val  
                          420                      425                      430  
 Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val Asn Gly His Lys Phe Ser  
                          435                      440                      445  
 Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr Tyr Gly Lys Leu Thr Leu  
                          450                      455                      460

Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro Val Pro Trp Pro Thr Leu  
 465 470 475 480  
 Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys Phe Ser Arg Tyr Pro Asp  
 485 490 495  
 His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser Ala Met Pro Glu Gly Tyr  
 500 505 510  
 Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp Asp Gly Asn Tyr Lys Thr  
 515 520 525  
 Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr Leu Val Asn Arg Ile Glu  
 530 535 540  
 Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly Asn Ile Leu Gly His Lys  
 545 550 555 560  
 Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val Tyr Ile Met Ala Asp Lys  
 565 570 575  
 Gln Lys Ile Lys Val Asn Phe Lys Ile Arg His Asn Ile Glu  
 580 585 590  
 Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr Gln Gln Asn Thr Pro Ile  
 595 600 605  
 Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn His Tyr Leu Ser Thr Gln  
 610 615 620  
 Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu Lys Arg Asp His Met Val Leu  
 625 630 635 640  
 Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu  
 645 650 655  
 Tyr Lys

&lt;210&gt; 15

<211> 1803

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (23)..(1795)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: IFN $\omega$  gene fused with HBsAg L p  
rotein gene

<400> 15

ctcgaggtcg agtataaaaa ca atg aga tct ttg ttg atc ttg gtt ttg tgt 52

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys

1

5

10

ttc ttg cca ttg gct gct ttg ggt aag gtt cga caa ggc atg ggg acg 100

Phe Leu Pro Leu Ala Ala Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr

15

20

25

aat ctt tct gtt ccc aat cct ctg gga ttc ttt ccc gat cac cag ttg 148

Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu

30

35

40

gac cct gcg ttc gga gcc aac tca aac aat cca gat tgg gac ttc aac 196

Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn

45

50

55

ccc aac aag gat caa tgg cca gag gca aat cag gta gga gcg gga gca 244  
Pro Asn Lys Asp Gln Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala

60

65

70

ttc ggg cca ggg ttc acc cca cca cac ggc ggt ctt ttg ggg tgg agc 292  
Phe Gly Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser

75

80

85

90

cct cag gct cag ggc ata ttg aca aca gtg cca gca gca cct cct cct 340  
Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro

95

100

105

gcc tcc acc aat cgg cag tca gga aga cag cct act ccc atc 388  
Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro

110

115

120

cct cta aga gac agt cat cct cag gcc atg cag tgg aat tcc aca aca 436  
Pro Leu Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr

125

130

135

ttc cac caa gct ctg cta gat ccc aga gtg agg ggc cta tat ttt cct 484  
Phe His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro

140

145

150

gct ggt ggc tcc agt tcc gga aca gta aac cct gtt ccg act act gcc 532  
Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala

155

160

165

170

tca ccc ata tct ggg gac cct gca ccg aac atg gag aac aca aca tca 580  
 Ser Pro Ile Ser Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser  
 175 180 185

gga ttc cta gga ccc ctg ctc gtg tta cag gcg ggg ttt ttc ttg ttg 628  
 Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu  
 190 195 200

aca aga atc ctc aca ata cca cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct 676  
 Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser  
 205 210 215

ctc aat ttt cta ggg gga gca ccc acg tgt cct ggc caa aat tcg cag 724  
 Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Pro Gly Gln Asn Ser Gln  
 220 225 230

tcc cca acc tcc aat cac tca cca acc tct tgt cct cca att tgt cct 772  
 Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro  
 235 240 245 250

ggc tat cgc tgg atg tgt ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc 820  
 Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile  
 255 260 265

ctg ctg cta tgc ctc atc ttc ttg ttg gtt ctt ctg gac tac caa ggt 868  
 Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly  
 270 275 280

atg ttg ccc gtt tgt cct cta ctt cca gga aca tca acc acc agc acg 916

Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr  
285 290 295

ggg cca tgc aag acc tgc acg att cct gct caa gga acc tct atg ttt 964  
Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe  
300 305 310

ccc tct tgt tgc tgt aca aaa cct tcg gac gga aac tgc act tgt att 1012  
Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile  
315 320 325 330

ccc atc cca tca tcc tgg gct ttc gca aga ttc cta tgg gag tgg gcc 1060  
Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala  
340 345

tca gtc cgt ttc tcc tgg ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg 1108  
Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp  
350 355 360

ttc gta ggg ctt tcc ccc act gtt tgg ctt tca gtt ata tgg atg atg 1156  
Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met  
365 370 375

tgg tat tgg ggg cca agt ctg tac aac atc ttg agt ccc ttt tta cct 1204  
Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro  
380 385 390

cta tta cca att ttc ttt tgt ctt tgg gta tat att gat tac aag gat 1252  
Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp



395

400

405

410

gac gac gat aag ata ccg gtg ggc tgt gat ctg cct cag aac cat ggc 1300

Asp Asp Asp Lys Ile Pro Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Asn His Gly

415

420

425

cta ctt agc agg aac acc ttg gtg ctt ctg cac caa atg agg aga atc 1348

Leu Leu Ser Arg Asn Thr Leu Val Leu Leu His Gln Met Arg Arg Ile

430

435

440

tcc cct ttc ttg tgt ctc aag gac aga aga gac ttc agg ttc ccc cag 1396

Ser Pro Phe Leu Cys Leu Lys Asp Arg Arg Asp Phe Arg Phe Pro Gln

445

450

455

gag atg gta aaa ggg agc cag ttg cag aag gcc cat gtc atg tct gtc 1444

Glu Met Val Lys Gly Ser Gln Leu Gln Lys Ala His Val Met Ser Val

460

465

470

ctc cat gag atg ctg cag cag atc ttc agc ctc ttc cac aca gag cgc 1492

Leu His Glu Met Leu Gln Gln Ile Phe Ser Leu Phe His Thr Glu Arg

475

480

485

490

tcc tct gct gcc tgg aac atg acc ctc cta gac caa ctc cac act gga 1540

Ser Ser Ala Ala Trp Asn Met Thr Leu Leu Asp Gln Leu His Thr Gly

495

500

505

ctt cat cag caa ctg caa cac ctg gag acc tgc ttg ctg cag gta gtg 1588

Leu His Gln Gln Leu Gln His Leu Glu Thr Cys Leu Leu Gln Val Val

510

515

520

gga gaa gga gaa tct gct ggg gca att agc agc cct gca ctg acc ttg 1636

Gly Glu Gly Glu Ser Ala Gly Ala Ile Ser Ser Pro Ala Leu Thr Leu

525

530

535

agg agg tac ttc cag gga atc cgt gtc tac ctg aaa gag aag aaa tac 1684

Arg Arg Tyr Phe Gln Gly Ile Arg Val Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr

540

545

550

agc gac tgt gcc tgg gaa gtt gtc aga atg gaa atc atg aaa tcc ttg 1732

Ser Asp Cys Ala Trp Glu Val Val Arg Met Glu Ile Met Lys Ser Leu

555

560

565

570

ttc tta tca aca aac atg caa gaa aga ctg aga agt aaa gat aga 1780

Phe Leu Ser Thr Asn Met Gln Glu Arg Leu Arg Ser Lys Asp Arg Asp

575

580

585

ctg ggc tca tct tga gcggccgc

1803

Leu Gly Ser Ser

590

<210> 16

<211> 590

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: IFN $\omega$  protein fused with HBsAg

L protein

&lt;400&gt; 16

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala

1 5 10 15

Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn

20 25 30

Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala

35 40 45

Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp

50 55 60

Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr

65 70 75 80

Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile

85 90 95

Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ile Ser Thr Asn Arg Gln

100 105 110

Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His

115 120 125

Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu

130 135 140

Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser

145 150 155 160

Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp

165 170 175

Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu

180 185 190

Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile

195 200 205

Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly

210 215 220

Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His  
 225 230 235 240  
 Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys  
 245 250 255  
 Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile  
 260 265 270  
 Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro  
 275 280 285  
 Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys  
 290 295 300  
 Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr  
 305 310 315 320  
 Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp  
 325 330 335  
 Ala Phe Ala Arg Leu Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp  
 340 345 350  
 Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro  
 355 360 365  
 Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser  
 370 375 380  
 Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe  
 385 390 395 400  
 Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ile Pro  
 405 410 415  
 Val Gly Cys Asp Leu Pro Gln Asn His Gly Leu Leu Ser Arg Asn Thr  
 420 425 430  
 Leu Val Leu Leu His Gln Met Arg Arg Ile Ser Pro Phe Leu Cys Leu  
 435 440 445  
 Lys Asp Arg Arg Asp Phe Arg Phe Pro Gln Glu Met Val Lys Gly Ser

450	455	460
Gln Leu Gln Lys Ala His Val Met Ser Val Leu His Glu Met Leu Gln		
465	470	475
Gln Ile Phe Ser Leu Phe His Thr Glu Arg Ser Ser Ala Ala Trp Asn		
485	490	495
Met Thr Leu Leu Asp Gln Leu His Thr Gly Leu His Gln Gln Leu Gln		
500	505	510
His Leu Glu Thr Cys Leu Leu Gln Val Val Gly Glu Gly Glu Ser Ala		
515	520	525
Gly Ala Ile Ser Ser Pro Ala Leu Thr Leu Arg Arg Tyr Phe Gln Gly		
530	535	540
Ile Arg Val Tyr Leu Lys Glu Lys Lys Tyr Ser Asp Cys Ala Trp Glu		
545	550	555
Val Val Arg Met Glu Ile Met Lys Ser Leu Phe Leu Ser Thr Asn Met		
565	570	575
Gln Glu Arg Leu Arg Ser Lys Asp Arg Asp Leu Gly Ser Ser		
580	585	590

<210> 17

<211> 1779

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (23)..(1771)

&lt;220&gt;

<223> Description of Artificial Sequence: IFN $\beta$  gene fused with HBsAg L protein gene

&lt;400&gt; 17

ctcgagggtcg agtataaaaa ca atg aga tct ttg ttg atc ttg gtt ttg tgt 52

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys

1 5 10

ttc ttg cca ttg gct gct ttg ggt aag gtt cga caa ggc atg ggg acg 100

Phe Leu Pro Leu Ala Ala Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr

15 20 25

aat ctt tct gtt ccc aat cct ctg gga ttc ttt ccc gat cac cag ttg

Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu

30 35 40

gac cct gcg ttc gga gcc aac tca aac aat cca gat tgg gac ttc aac 196

Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn

45 50 55

ccc aac aag gat caa tgg cca gag gca aat cag gta gga gcg gga gca 244

Pro Asn Lys Asp Gln Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala

60 65 70

ttc ggg cca ggg ttc acc cca cca cac ggc ggt ctt ttg ggg tgg agc 292

Phe Gly Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser

75 80 85 90

cct cag gct cag ggc ata ttg aca aca gtg cca gca gca cct cct cct 340  
Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro

95

100

105

gcc tcc acc aat cgg cag tca gga aga cag cct act ccc atc tct cca 388  
Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro

110

115

120

cct cta aga gac agt cat cct cag gcc atg cag tgg aat tcc aca aca 436  
Pro Leu Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr

125

130

135

ttc cac caa gct ctg cta gat ccc aga gtg agg ggc cta tat ttt cct 484  
Phe His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gln Leu Tyr Phe Pro

140

145

150

gct ggt ggc tcc agt tcc gga aca gta aac cct gtt ccg act act gcc 532  
Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala

155

160

165

170

tca ccc ata tct ggg gac cct gca ccg aac atg gag aac aca aca tca 580  
Ser Pro Ile Ser Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser

175

180

185

gga ttc cta gga ccc ctg ctc gtg tta cag gcg ggg ttt ttc ttg ttg 628  
Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu

190

195

200

aca aga atc ctc aca ata cca cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct 676

Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser  
205 210 215

ctc aat ttt cta ggg gga gca ccc acg tgt cct ggc caa aat tcg cag 724  
Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln  
220 225 230

tcc cca acc tcc aat cac tca cca acc tct tgt cct cca att tgt cct 772  
Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro  
235 240 245 250

ggc tat cgc tgg atg tgt ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc 820  
Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile  
255 260 265

ctg ctg cta tgc ctc atc ttc ttg ttg gtt ctt ctg gac tac caa ggt 868  
Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly  
270 275 280

atg ttg ccc gtt tgt cct cta ctt cca gga aca tca acc acc agc acg 916  
Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr  
285 290 295

ggg cca tgc aag acc tgc acg att cct gct caa gga acc tct atg ttt 964  
Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe  
300 305 310

ccc tct tgt tgc tgt aca aaa cct tcg gac gga aac tgc act tgt att 1012  
Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile



315

320

325

330

ccc atc cca tca tcc tgg gct ttc gca aga ttc cta tgg gag tgg gcc 1060

Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala

335

340

345

tca gtc cgt ttc tcc tgg ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg 1108

Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp

350

355

360

ttc gta ggg ctt tcc ccc act gtt tgg ctt tca gtt ata tgg atg atg 1156

Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met

365

370

375

tgg ggg cca agt ctg tac aac atc ttg agt ccc ttt tta cct 1204

Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro

380

385

390

cta tta cca att ttc ttt tgt ctt tgg gta tat att gat tac aag gat 1252

Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp

395

400

405

410

gac gac gat aag ata ccg gtg agc tac aac ttg ctt gga ttc cta caa 1300

Asp Asp Asp Lys Ile Pro Val Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln

415

420

425

aga agc agc aat ttt cag tgt cag aag ctc ctg tgg caa ttg aat ggg 1348

Arg Ser Ser Asn Phe Gln Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly

430

435

440

agg ctt gaa tac tgc ctc aag gac agg atg aac ttt gac atc cct gag 1396

Arg Leu Glu Tyr Cys Leu Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu

445

450

455

gag att aag cag ctg cag cag ttc cag aag gag gac gcc gca ttg acc 1444

Glu Ile Lys Gln Leu Gln Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr

460

465

470

atc tat gag atg ctc cag aac atc ttt gct att ttc aga caa gat tca 1492

Ile Tyr Glu Met Leu Gln Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser

475

480

485

490

tct agc act ggc tgg aat gag act att gtt gag aac ctc ctg gct aat 1544

Ser Ser Thr Gly Trp Asn Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn

495

500

505

gtc tat cat cag ata aac cat ctg aag aca gtc ctg gaa gaa aaa ctg 1588

Val Tyr His Gln Ile Asn His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu

510

515

520

gag aaa gaa gat ttc acc agg gga aaa ctc atg agc agt ctg cac ctg 1636

Glu Lys Glu Asp Phe Thr Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu

525

530

535

aaa aga tat tat ggg agg att ctg cat tac ctg aag gcc aag gag tac 1684

Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr

540

545

550

agt cac tgt gcc tgg acc ata gtc aga gtg gaa atc cta agg aac ttt 1732  
 Ser His Cys Ala Trp Thr Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe  
 555 560 565 570

tac ttc att aac aga ctt aca ggt tac ctc cga aac tga gcggccgc 1779  
 Tyr Phe Ile Asn Arg Leu Thr Gly Tyr Leu Arg Asn  
 575 580

<210> 18

<211> 582

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence: IFN $\beta$  protein fused with HBsAg  
 L protein

<400> 18

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn  
 20 25 30  
 Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala  
 35 40 45  
 Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp  
 50 55 60

Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr  
 65 70 75 80  
 Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile  
 85 90 95  
 Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln  
 100 105 110  
 Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His  
 115 120 125  
 Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu  
 130 135 140  
 Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser  
 145 150 155 160  
 Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp  
 165 170 175  
 Pro Ala Pro Asn Met Glu Ser Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu  
 180 185 190  
 Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile  
 195 200 205  
 Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly  
 210 215 220  
 Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His  
 225 230 235 240  
 Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys  
 245 250 255  
 Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile  
 260 265 270  
 Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro  
 275 280 285  
 Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys

290	295	300
Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr		
305	310	315 320
Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp		
325	330	335
Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp		
340	345	350
Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro		
355	360	365
Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser		
370	375	380
Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe		
385	390	395 400
Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ile Pro		
405	410	415
Val Ser Tyr Asn Leu Leu Gly Phe Leu Gln Arg Ser Ser Asn Phe Gln		
420	425	430
Cys Gln Lys Leu Leu Trp Gln Leu Asn Gly Arg Leu Glu Tyr Cys Leu		
435	440	445
Lys Asp Arg Met Asn Phe Asp Ile Pro Glu Glu Ile Lys Gln Leu Gln		
450	455	460
Gln Phe Gln Lys Glu Asp Ala Ala Leu Thr Ile Tyr Glu Met Leu Gln		
465	470	475 480
Asn Ile Phe Ala Ile Phe Arg Gln Asp Ser Ser Ser Thr Gly Trp Asn		
485	490	495
Glu Thr Ile Val Glu Asn Leu Leu Ala Asn Val Tyr His Gln Ile Asn		
500	505	510
His Leu Lys Thr Val Leu Glu Glu Lys Leu Glu Lys Glu Asp Phe Thr		
515	520	525

Arg Gly Lys Leu Met Ser Ser Leu His Leu Lys Arg Tyr Tyr Gly Arg

530

535

540

Ile Leu His Tyr Leu Lys Ala Lys Glu Tyr Ser His Cys Ala Trp Thr

545

550

555

560

Ile Val Arg Val Glu Ile Leu Arg Asn Phe Tyr Phe Ile Asn Arg Leu

565

570

575

Thr Gly Tyr Leu Arg Asn

580

<210> 19

<211> 3359

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<221> CDS

<222> (23)..(3352)

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:HGF gene fused with HBsAg L protein gene

<400> 19

ctcgaggtcg agtataaaaa ca atg aga tct ttg ttg atc ttg gtt ttg tgt 52

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys

1

5

10

ttc ttg cca ttg gct gct ttg ggt aag gtt cga caa ggc atg ggg acg 100  
Phe Leu Pro Leu Ala Ala Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr

15

20

25

aat ctt tct gtt ccc aat cct ctg gga ttc ttt ccc gat cac cag ttg 148  
Asn Leu Ser Val Pro Asn Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu

30

35

40

gac cct gcg ttc gga gcc aac tca aac aat cca gat tgg gac ttc aac 196  
Asp Pro Ala Phe Gly Ala Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn

45

50

55

ccc aac aag gat caa tgg cca gag gca aat cag gta gga gga gca 244  
Pro Asn Lys Asp Gln Trp Pro Glu Ala Asn Gln Val Gln Ala Gly Ala

60

65

70

ttc ggg cca ggg ttc acc cca cca cac ggc ggt ctt ttg ggg tgg agc 292  
Phe Gly Pro Gly Phe Thr Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser

75

80

85

90

cct cag gct cag ggc ata ttg aca aca gtg cca gca gca cct cct cct 340  
Pro Gln Ala Gln Gly Ile Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro

95

100

105

gcc tcc acc aat cgg cag tca gga aga cag cct act ccc atc tct cca 388  
Ala Ser Thr Asn Arg Gln Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro

110

115

120

cct cta aga gac agt cat cct cag gcc atg cag tgg aat tcc aca aca 436

Pro Leu Arg Asp Ser His Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr

125

130

135

ttc cac caa gct ctg cta gat ccc aga gtg agg ggc cta tat ttt cct 484

Phe His Gln Ala Leu Leu Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro

140

145

150

gct ggt ggc tcc agt tcc gga aca gta aac cct gtt ccg act act gcc 532

Ala Gly Gly Ser Ser Ser Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala

155

160

165

170

tca ccc ata tct ggg gac cct gca ccg aac atg gag aac aca aca tca 580

Ser Pro Ile Ser Gly Asp Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser

175

180

185

gga ttc cta gga ccc ctg ctc gtg tta cag gcg ggg ttt ttc ttg ttg 628

Gly Phe Leu Gly Pro Leu Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu

190

195

200

aca aga atc ctc aca ata cca cag agt cta gac tcg tgg tgg act tct 676

Thr Arg Ile Leu Thr Ile Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser

205

210

215

ctc aat ttt cta ggg gga gca ccc acg tgt cct ggc caa aat tcg cag 724

Leu Asn Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln

220

225

230

tcc cca acc tcc aat cac tca cca acc tct tgt cct cca att tgt cct 772



Ser Pro Thr Ser Asn His Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro  
 235 240 245 250

ggc tat cgc tgg atg tgt ctg cgg cgt ttt atc ata ttc ctc ttc atc 820  
 Gly Tyr Arg Trp Met Cys Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile  
 255 260 265

ctg ctg cta tgc ctc atc ttc ttg ttg gtt ctt ctg gac tac caa ggt 868  
 Leu Leu Leu Cys Leu Ile Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly  
 270 275 280

atg ttg ccc gtt tgt cct cta ctt cca gga aca tca acc acc agc acg 916  
 Met Leu Pro Val Cys Pro Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr  
 285 290 295

ggg cca tgc aag acc tgc acg att cct gct caa gga acc tct atg ttt 964  
 Gly Pro Cys Lys Thr Cys Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe  
 300 305 310

ccc tct tgt tgc tgt aca aaa cct tcg gac gga aac tgc act tgt att 1012  
 Pro Ser Cys Cys Cys Thr Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile  
 315 320 325 330

ccc atc cca tca tcc tgg gct ttc gca aga ttc cta tgg gag tgg gcc 1060  
 Pro Ile Pro Ser Ser Trp Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala  
 335 340 345

tca gtc cgt ttc tcc tgg ctc agt tta cta gtg cca ttt gtt cag tgg 1108  
 Ser Val Arg Phe Ser Trp Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp

350

355

360

ttc gta ggg ctt tcc ccc act gtt tgg ctt tca gtt ata tgg atg atg 1156

Phe Val Gly Leu Ser Pro Thr Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met

365

370

375

tgg tat tgg ggg cca agt ctg tac aac atc ttg agt ccc ttt tta cct 1204

Trp Tyr Trp Gly Pro Ser Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro

380

385

390

cta tta cca att ttc ttt tgt ctt tgg gta tat att gat tac aag gat 1252

Leu Leu Pro Ile Phe Phe Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp

395

400

405

410

gac gac gat aag ata ccg gta caa agg aaa aga aga aat aca att cat 1300

Asp Asp Asp Lys Ile Pro Val Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His

415

420

425

gaa ttc aaa aaa tca gca aag act acc cta atc aaa ata gat cca gca 1348

Glu Phe Lys Lys Ser Ala Lys Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala

430

435

440

ctg aag ata aaa acc aaa aaa gtg aat act gca gac caa tgt gct aat 1396

Leu Lys Ile Lys Thr Lys Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn

445

450

455

aga tgt act agg aat aaa gga ctt cca ttc act tgc aag gct ttt gtt 1444

Arg Cys Thr Arg Asn Lys Gly Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val

460

465

470

ttt gat aaa gca aga aaa caa tgc ctc tgg ttc ccc ttc aat agc atg 1492

Phe Asp Lys Ala Arg Lys Gln Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met

475 480 485 490

tca agt gga gtg aaa aaa gaa ttt ggc cat gaa ttt gac ctc tat gaa 1540

Ser Ser Gly Val Lys Lys Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu

495 500 505

aac aaa gac tac att aga aac tgc atc att ggt aaa gga cgc agc tac 1588

Asn Lys Asp Tyr Ile Arg Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr

510 515 520

aag gga aca gta tct atc act aag agt ggc atc aaa tgt cag cca tgg 1636

Lys Gly Thr Val Ser Ile Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Glu Pro Arg

525 530 535

agt tcc atg ata cca cac gaa cac agc tat cgg ggt aaa gac cta cag 1684

Ser Ser Met Ile Pro His Glu His Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln

540 545 550

gaa aac tac tgt cga aat cca cga ggg gaa gaa ggg gga ccc tgg tgt 1732

Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys

555 560 565 570

ttc aca agc aat cca gag gta cgc tac gaa gtc tgt gac att cct cag 1780

Phe Thr Ser Asn Pro Glu Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln

575 580 585

tgt tca gaa gtt gaa tgc atg acc tgc aat ggg gag agt tat cga ggt 1828

Cys Ser Glu Val Glu Cys Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly

590

595

600

ctc atg gat cat aca gaa tca ggc aag att tgt cag cgc tgg gat cat 1876

Leu Met Asp His Thr Glu Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His

605

610

615

cag aca cca cac cgg cac aaa ttc ttg cct gaa aga tat ccc gac aag 1924

Gln Thr Pro His Arg His Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys

620

625

630

ggc ttt gat gat aat tat tgc cgc aat ccc gat ggc cag ccg agg cca 1972

Gly Phe Asp Asp Asn Tyr Cys Arg Asp Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro

635

640

645

650

tgg tgc tat act ctt gac cct cac acc cgc tgg gag tac tgt gca att 2020

Trp Cys Tyr Thr Leu Asp Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile

655

660

665

aaa aca tgc gct gac aat act atg aat gac act gat gtt cct ttg gaa 2068

Lys Thr Cys Ala Asp Asn Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu

670

675

680

aca act gaa tgc atc caa ggt caa gga gaa ggc tac agg ggc act gtc 2116

Thr Thr Glu Cys Ile Gln Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val

685

690

695

aat acc att tgg aat gga att cca tgt cag cgt tgg gat tct cag tat 2164

Asn Thr Ile Trp Asn Gly Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr

700

705

710

cct cac gag cat gac atg act cct gaa aat ttc aag tgc aag gac cta 2212

Pro His Glu His Asp Met Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu

715

720

725

730

cga gaa aat tac tgc cga aat cca gat ggg tct gaa tca ccc tgg tgt 2260

Arg Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys

735

740

745

ttt acc act gat cca aac atc cga gtt ggc tac tgc tcc caa att cca 2308

Phe Thr Thr Asp Pro Asn Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro

750

755

760

aac tgt gat atg tca cat gga caa gat tgt tat cgt ggg aat ggc aaa 2356

Asn Cys Asp Met Ser His Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys

765

770

775

aat tat atg ggc aac tta tcc caa aca aga tct gga cta aca tgt tca 2404

Asn Tyr Met Gly Asn Leu Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser

780

785

790

atg tgg gac aag aac atg gaa gac tta cat cgt cat atc ttc tgg gaa 2452

Met Trp Asp Lys Asn Met Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu

795

800

805

810

cca gat gca agt aag ctg aat gag aat tac tgc cga aat cca gat gat 2500

Pro Asp Ala Ser Lys Leu Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp

815

820

825

gat gct cat gga ccc tgg tgc tac acg gga aat cca ctc att cct tgg 2548

Asp Ala His Gly Pro Trp Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp

830

835

840

gat tat tgc cct att tct cgt tgt gaa ggt gat acc aca cct aca ata 2596

Asp Tyr Cys Pro Ile Ser Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile

845

850

855

gtc aat tta gac cat ccc gta ata tct tgt gcc aaa acg aaa caa ttg 2644

Val Asn Leu Asp His Pro Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu

860

865

870

cga gtt gta aat ggg att cca aca cga aca aac ata gga tgg atg gtt 2692

Arg Val Val Asn Gly Ile Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val

875

880

885

890

agt ttg aga tac aga aat aaa cat atc tgc gga gga tca ttg ata aag 2740

Ser Leu Arg Tyr Arg Asn Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys

895

900

905

gag agt tgg gtt ctt act gca cga cag tgt ttc cct tct cgt gac ttg 2788

Glu Ser Trp Val Leu Thr Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu

910

915

920

aaa gat tat gaa gct tgg ctt gga att cat gat gtc cac gga aga gga 2836

Lys Asp Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly

925

930

935

gat gag aaa tgc aaa cag gtt ctc aat gtt tcc cag ctg gta tat ggc 2884

Asp Glu Lys Cys Lys Gln Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly

940

945

950

cct gaa gga tca gat ctg gtt tta atg aag ctt gcc agg cct gct gtc 2932

Pro Glu Gly Ser Asp Leu Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val

955

960

965

970

ctg gat gat ttt gtt agt acg att gat tta cct aat tat gga tgc aca 2980

Leu Asp Asp Phe Val Ser Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr

975

980

985

att cct gaa aag acc agt tgc agt gtt tat ggc tgg ggc tac act 3028

Ile Pro Glu Lys Thr Ser Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr

990

995

1000

ttg atc aac tat gat ggc cta tta cga gtg gca cat ctc tat ata atg 3076

Leu Ile Asn Tyr Asp Gly Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met

1005

1010

1015

gga aat gag aaa tgc agc cag cat cat cga ggg aag gtg act ctg aat 3124

Gly Asn Glu Lys Cys Ser Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn

1020

1025

1030

gag tct gaa ata tgt gct ggg gct gaa aag att gga tca gga cca tgt 3172

Glu Ser Glu Ile Cys Ala Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys

1035

1040

1045

1050

gag ggg gat tat ggt ggc cca ctt gtt tgt gag caa cat aaa atg aga 3220

Glu Gly Asp Tyr Gly Gly Pro Leu Val Cys Glu Gln His Lys Met Arg

1055

1060

1065

atg gtt ctt ggt gtc att gtt cct ggt cgt gga tgt gcc att cca aat 3268

Met Val Leu Gly Val Ile Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn

1070

1075

1080

cgt cct ggt att ttt gtc cga gta gca tat tat gca aaa tgg ata cac 3316

Arg Pro Gly Ile Phe Val Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His

1085

1090

1095

aaa att att tta aca tat aag gta cca cag tca tag cggccgc 3359

Lys Ile Ile Leu Thr Tyr Lys Val Pro Glu Ser

1100

1105

1110

<210> 20

<211> 1109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<223> Description of Artificial Sequence:HGF protein fused with HBsAg L protein

<400> 20

Met Arg Ser Leu Leu Ile Leu Val Leu Cys Phe Leu Pro Leu Ala Ala

1

5

10

15

Leu Gly Lys Val Arg Gln Gly Met Gly Thr Asn Leu Ser Val Pro Asn



20	25	30
Pro Leu Gly Phe Phe Pro Asp His Gln Leu Asp Pro Ala Phe Gly Ala		
35	40	45
Asn Ser Asn Asn Pro Asp Trp Asp Phe Asn Pro Asn Lys Asp Gln Trp		
50	55	60
Pro Glu Ala Asn Gln Val Gly Ala Gly Ala Phe Gly Pro Gly Phe Thr		
65	70	75
Pro Pro His Gly Gly Leu Leu Gly Trp Ser Pro Gln Ala Gln Gly Ile		
85	90	95
Leu Thr Thr Val Pro Ala Ala Pro Pro Pro Ala Ser Thr Asn Arg Gln		
100	105	110
Ser Gly Arg Gln Pro Thr Pro Ile Ser Pro Pro Leu Arg Asp Ser His		
115	120	125
Pro Gln Ala Met Gln Trp Asn Ser Thr Thr Phe His Gln Ala Leu Leu		
130	135	140
Asp Pro Arg Val Arg Gly Leu Tyr Phe Pro Ala Gly Gly Ser Ser Ser		
145	150	155
Gly Thr Val Asn Pro Val Pro Thr Thr Ala Ser Pro Ile Ser Gly Asp		
165	170	175
Pro Ala Pro Asn Met Glu Asn Thr Thr Ser Gly Phe Leu Gly Pro Leu		
180	185	190
Leu Val Leu Gln Ala Gly Phe Phe Leu Leu Thr Arg Ile Leu Thr Ile		
195	200	205
Pro Gln Ser Leu Asp Ser Trp Trp Thr Ser Leu Asn Phe Leu Gly Gly		
210	215	220
Ala Pro Thr Cys Pro Gly Gln Asn Ser Gln Ser Pro Thr Ser Asn His		
225	230	235
Ser Pro Thr Ser Cys Pro Pro Ile Cys Pro Gly Tyr Arg Trp Met Cys		
245	250	255

Leu Arg Arg Phe Ile Ile Phe Leu Phe Ile Leu Leu Leu Cys Leu Ile  
 260 265 270  
 Phe Leu Leu Val Leu Leu Asp Tyr Gln Gly Met Leu Pro Val Cys Pro  
 275 280 285  
 Leu Leu Pro Gly Thr Ser Thr Thr Ser Thr Gly Pro Cys Lys Thr Cys  
 290 295 300  
 Thr Ile Pro Ala Gln Gly Thr Ser Met Phe Pro Ser Cys Cys Cys Thr  
 305 310 315 320  
 Lys Pro Ser Asp Gly Asn Cys Thr Cys Ile Pro Ile Pro Ser Ser Trp  
 325 330 335  
 Ala Phe Ala Arg Phe Leu Trp Glu Trp Ala Ser Val Arg Phe Ser Trp  
 340 345 350  
 Leu Ser Leu Leu Val Pro Phe Val Gln Trp Phe Val Gly Leu Ser Pro  
 355 360 365  
 Val Trp Leu Ser Val Ile Trp Met Met Trp Tyr Trp Gly Pro Ser  
 370 375 380  
 Leu Tyr Asn Ile Leu Ser Pro Phe Leu Pro Leu Leu Pro Ile Phe Phe  
 385 390 395 400  
 Cys Leu Trp Val Tyr Ile Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ile Pro  
 405 410 415  
 Val Gln Arg Lys Arg Arg Asn Thr Ile His Glu Phe Lys Lys Ser Ala  
 420 425 430  
 Lys Thr Thr Leu Ile Lys Ile Asp Pro Ala Leu Lys Ile Lys Thr Lys  
 435 440 445  
 Lys Val Asn Thr Ala Asp Gln Cys Ala Asn Arg Cys Thr Arg Asn Lys  
 450 455 460  
 Gly Leu Pro Phe Thr Cys Lys Ala Phe Val Phe Asp Lys Ala Arg Lys  
 465 470 475 480  
 Gln Cys Leu Trp Phe Pro Phe Asn Ser Met Ser Ser Gly Val Lys Lys

	485	490	495
Glu Phe Gly His Glu Phe Asp Leu Tyr Glu Asn Lys Asp Tyr Ile Arg			
500	505	510	
Asn Cys Ile Ile Gly Lys Gly Arg Ser Tyr Lys Gly Thr Val Ser Ile			
515	520	525	
Thr Lys Ser Gly Ile Lys Cys Gln Pro Trp Ser Ser Met Ile Pro His			
530	535	540	
Glu His Ser Tyr Arg Gly Lys Asp Leu Gln Glu Asn Tyr Cys Arg Asn			
545	550	555	560
Pro Arg Gly Glu Glu Gly Gly Pro Trp Cys Phe Thr Ser Asn Pro Glu			
565	570	575	
Val Arg Tyr Glu Val Cys Asp Ile Pro Gln Cys Ser Glu Val Glu Cys			
580	585	590	
Met Thr Cys Asn Gly Glu Ser Tyr Arg Gly Leu Met Asp His Thr Glu			
595	600	605	
Ser Gly Lys Ile Cys Gln Arg Trp Asp His Gln Thr Pro His Arg His			
610	615	620	
Lys Phe Leu Pro Glu Arg Tyr Pro Asp Lys Gly Phe Asp Asp Asn Tyr			
625	630	635	640
Cys Arg Asn Pro Asp Gly Gln Pro Arg Pro Trp Cys Tyr Thr Leu Asp			
645	650	655	
Pro His Thr Arg Trp Glu Tyr Cys Ala Ile Lys Thr Cys Ala Asp Asn			
660	665	670	
Thr Met Asn Asp Thr Asp Val Pro Leu Glu Thr Thr Glu Cys Ile Gln			
675	680	685	
Gly Gln Gly Glu Gly Tyr Arg Gly Thr Val Asn Thr Ile Trp Asn Gly			
690	695	700	
Ile Pro Cys Gln Arg Trp Asp Ser Gln Tyr Pro His Glu His Asp Met			
705	710	715	720

Thr Pro Glu Asn Phe Lys Cys Lys Asp Leu Arg Glu Asn Tyr Cys Arg			
725	730	735	
Asn Pro Asp Gly Ser Glu Ser Pro Trp Cys Phe Thr Thr Asp Pro Asn			
740	745	750	
Ile Arg Val Gly Tyr Cys Ser Gln Ile Pro Asn Cys Asp Met Ser His			
755	760	765	
Gly Gln Asp Cys Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Tyr Met Gly Asn Leu			
770	775	780	
Ser Gln Thr Arg Ser Gly Leu Thr Cys Ser Met Trp Asp Lys Asn Met			
785	790	795	800
Glu Asp Leu His Arg His Ile Phe Trp Glu Pro Asp Ala Ser Lys Leu			
805	810	815	
Asn Glu Asn Tyr Cys Arg Asn Pro Asp Asp Ala His Gly Pro Trp			
820	825	830	
Cys Tyr Thr Gly Asn Pro Leu Ile Pro Trp Asp Lys Cys Pro Ile Ser			
835	840	845	
Arg Cys Glu Gly Asp Thr Thr Pro Thr Ile Val Asn Leu Asp His Pro			
850	855	860	
Val Ile Ser Cys Ala Lys Thr Lys Gln Leu Arg Val Val Asn Gly Ile			
865	870	875	880
Pro Thr Arg Thr Asn Ile Gly Trp Met Val Ser Leu Arg Tyr Arg Asn			
885	890	895	
Lys His Ile Cys Gly Gly Ser Leu Ile Lys Glu Ser Trp Val Leu Thr			
900	905	910	
Ala Arg Gln Cys Phe Pro Ser Arg Asp Leu Lys Asp Tyr Glu Ala Trp			
915	920	925	
Leu Gly Ile His Asp Val His Gly Arg Gly Asp Glu Lys Cys Lys Gln			
930	935	940	
Val Leu Asn Val Ser Gln Leu Val Tyr Gly Pro Glu Gly Ser Asp Leu			

945                      950                      955                      960  
 Val Leu Met Lys Leu Ala Arg Pro Ala Val Leu Asp Asp Phe Val Ser  
                          965                      970                      975  
 Thr Ile Asp Leu Pro Asn Tyr Gly Cys Thr Ile Pro Glu Lys Thr Ser  
                          980                      985                      990  
 Cys Ser Val Tyr Gly Trp Gly Tyr Thr Gly Leu Ile Asn Tyr Asp Gly  
                          995                      1000                      1005  
 Leu Leu Arg Val Ala His Leu Tyr Ile Met Gly Asn Glu Lys Cys Ser  
                          1010                      1015                      1020  
 Gln His His Arg Gly Lys Val Thr Leu Asn Glu Ser Glu Ile Cys Ala  
                          1025                      1030                      1035                      1040  
 Gly Ala Glu Lys Ile Gly Ser Gly Pro Cys Glu Gly Asp Tyr Gly Gly  
                          1045                      1050                      1055  
 Pro Leu Val Cys Glu Glu His Lys Met Arg Met Val Leu Gly Val Ile  
                          1060                      1065                      1070  
 Val Pro Gly Arg Gly Cys Ala Ile Pro Asn Arg Pro Gly Ile Phe Val  
                          1075                      1080                      1085  
 Arg Val Ala Tyr Tyr Ala Lys Trp Ile His Lys Ile Ile Leu Thr Tyr  
                          1090                      1095                      1100  
 Lys Val Pro Gln Ser  
 1105

# 【図面の簡単な説明】

## 【図 1】

本発明の薬剤を構成する粒子の概略模式図であって、粒子を形成する H B s A g L タンパク質にタンパク質薬剤が融合された状態を示す図である。

## 【図 2】

本発明の実施例における H B s A g L タンパク質遺伝子の各タンパク質領域を表す概略模式図である。1～8 は、表面抗原における各部位の働きを示している

## 【図3】

本発明の実施例における遺伝子組換え酵母を用いたHBsAg Lタンパク質粒子の発現および精製操作を例示した概略説明図である。(a) 遺伝子組換え酵母の作成、(b) High-Pi培地における培養、(c) 8S5N-P400培地における培養、(d) 破碎、(e) 密度勾配遠心分離、(f) HBsAg Lタンパク質粒子。

## 【図4】

本発明の実施例における、HBsAg Lタンパク質とEGFPとの融合タンパク質を発現するプラスミドの作製方法を説明する図である。

## 【図5】

本発明の実施例における、HBsAg Lタンパク質とEGFPとの融合タンパク質によってEGFPを導入した、ヒト肝癌細胞HepG2の共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真を示した図である。

## 【図6】

本発明の実施例における、HBsAg Lタンパク質とEGFPとの融合タンパク質によってEGFPを導入した、ヒト扁平上皮癌由来細胞A431の共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真を示した図である。

## 【図7】

本発明の実施例における、HBsAg Lタンパク質とEGFPとの融合タンパク質を静脈注射した、ヒト肝癌由来HuH-7細胞を移植された胆癌マウスの腫瘍部の共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真を示した図である。

## 【図8】

本発明の実施例における、HBsAg Lタンパク質とEGFPとの融合タンパク質を静脈注射した、ヒト大腸癌由来WiDr細胞を移植された胆癌マウスの腫瘍部の共焦点レーザー蛍光顕微鏡写真を示した図である。

## 【符号の説明】

- 1 粒子形成抑制部位
- 2 直接的ヒト肝細胞特異的レセプター

3 糖鎖 1

4 間接的なヒト肝細胞特異的レセプター（血清重合アルブミンレセプタ

ー）

5 膜貫通領域 1

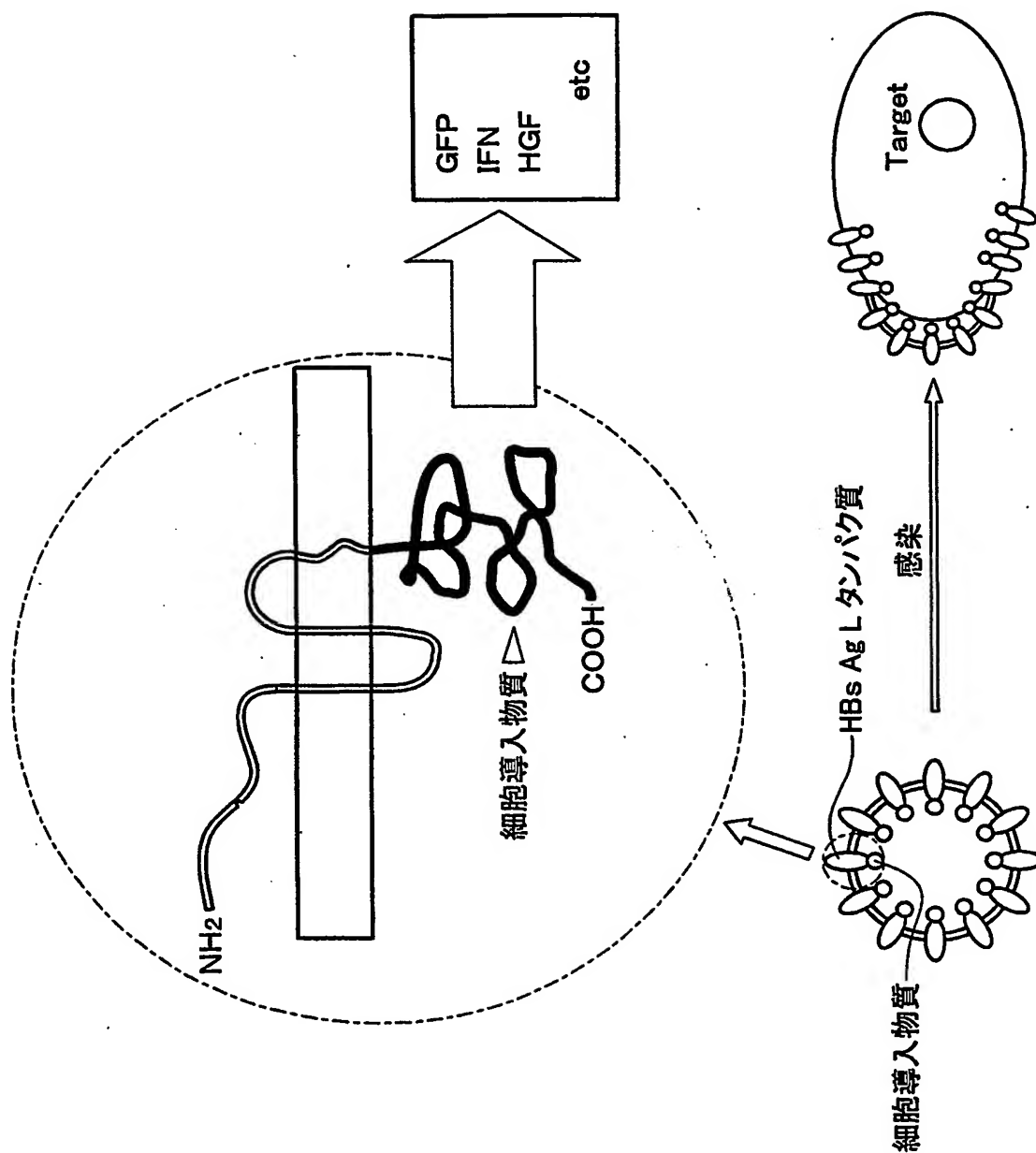
6 膜貫通領域 2

7 糖鎖 2

8 膜貫通領域 3

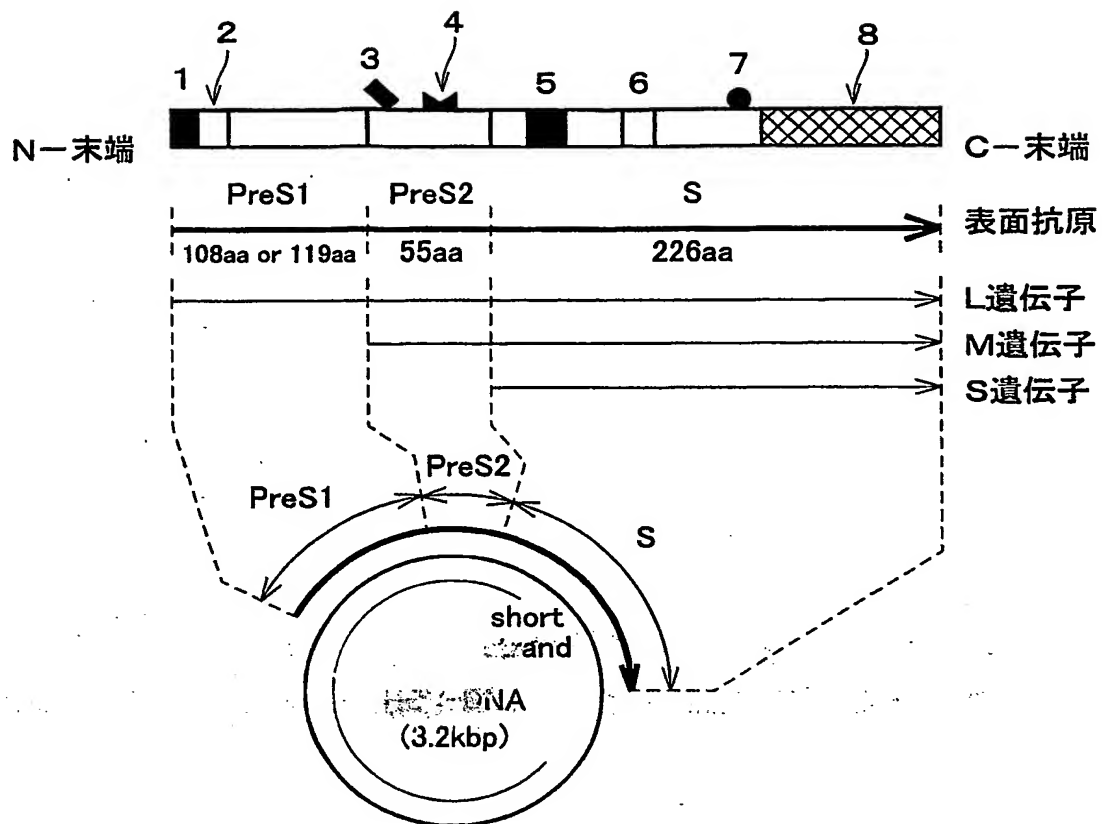
【書類名】 図面

【図1】



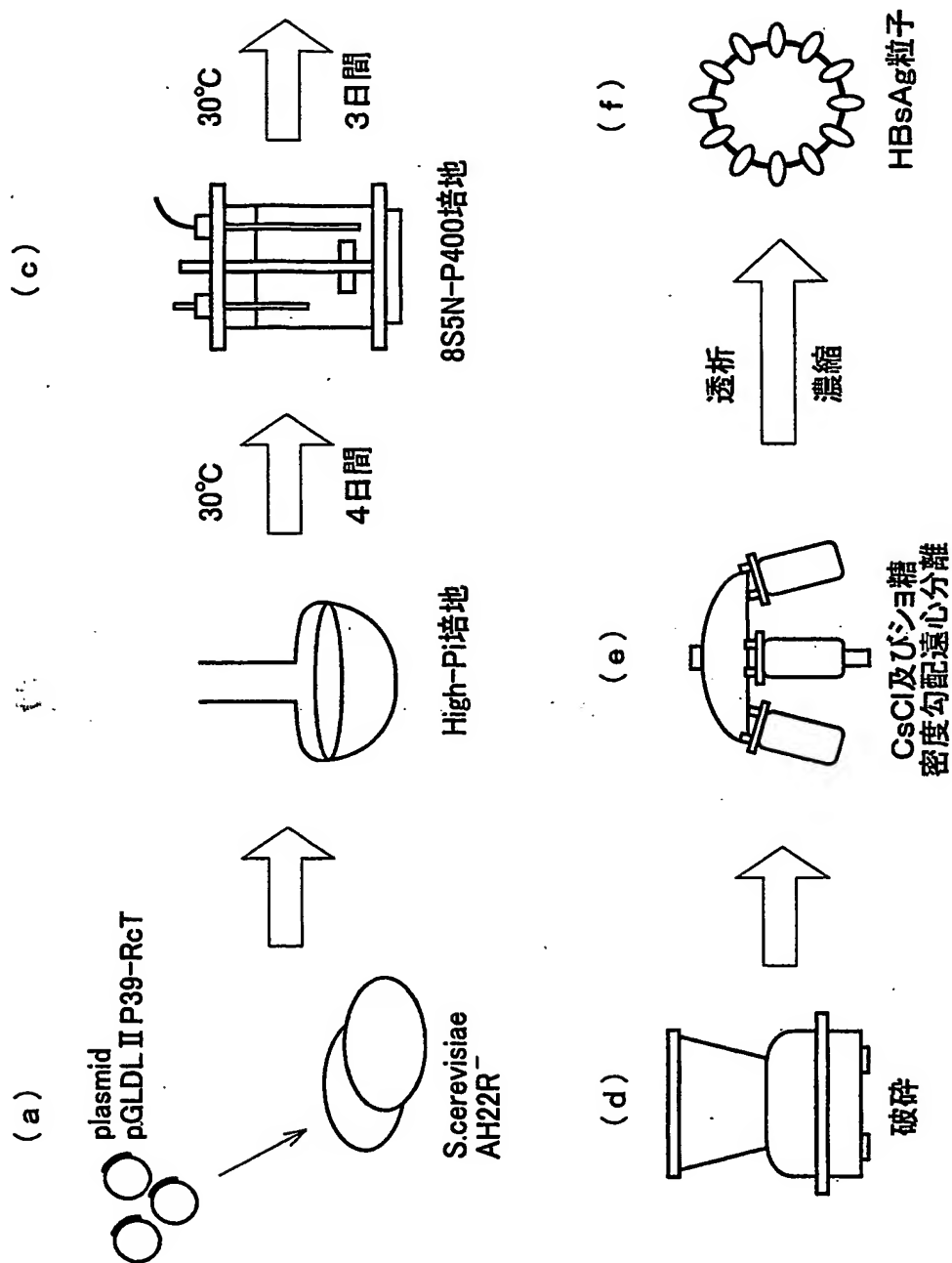


【図2】

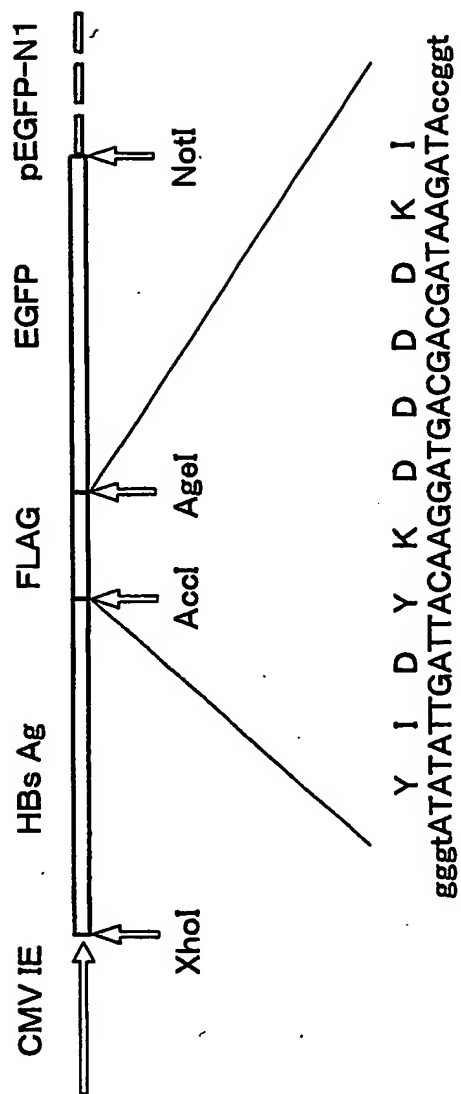


- 1 粒子形成抑制部位
- 2 直接的なヒト肝細胞特異的レセプター
- 3 糖鎖1
- 4 間接的なヒト肝細胞特異的レセプター(重合ヒト血清アルブミンレセプター)
- 5 膜貫通領域1
- 6 膜貫通領域2
- 7 糖鎖2
- 8 膜貫通領域3

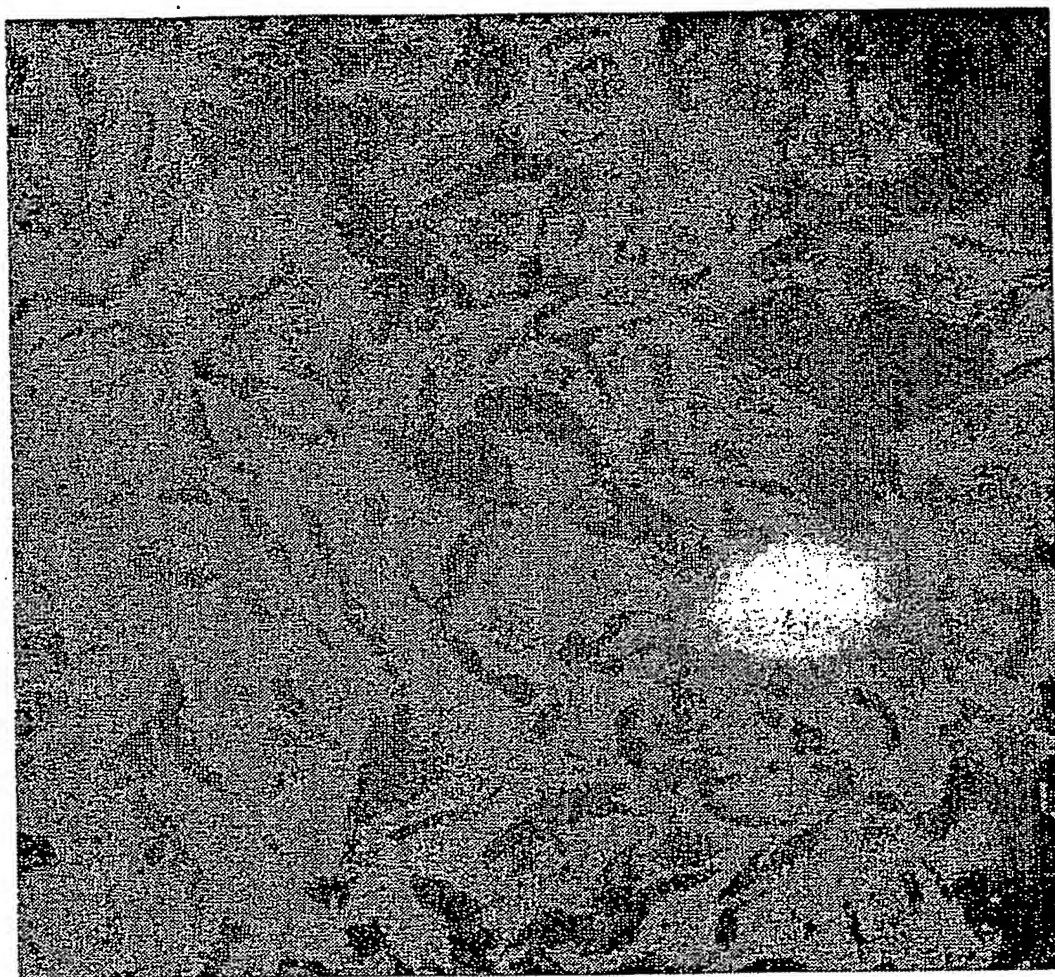
【図3】



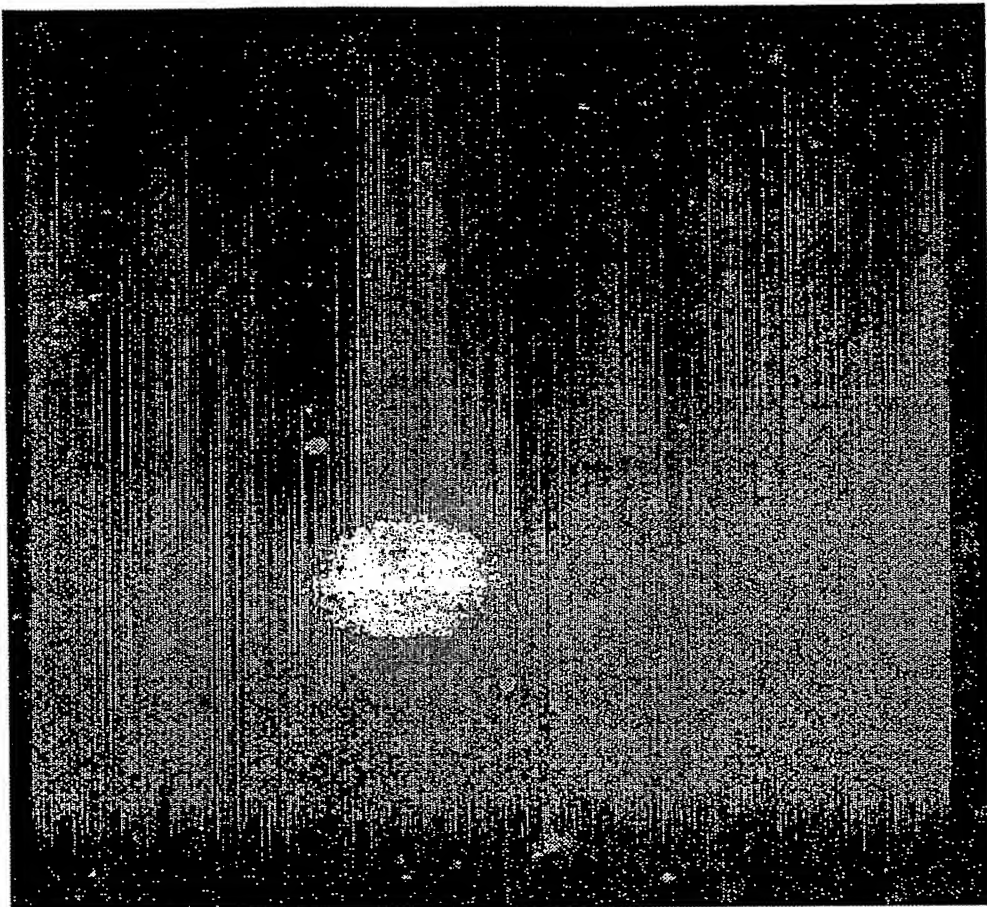
【図4】



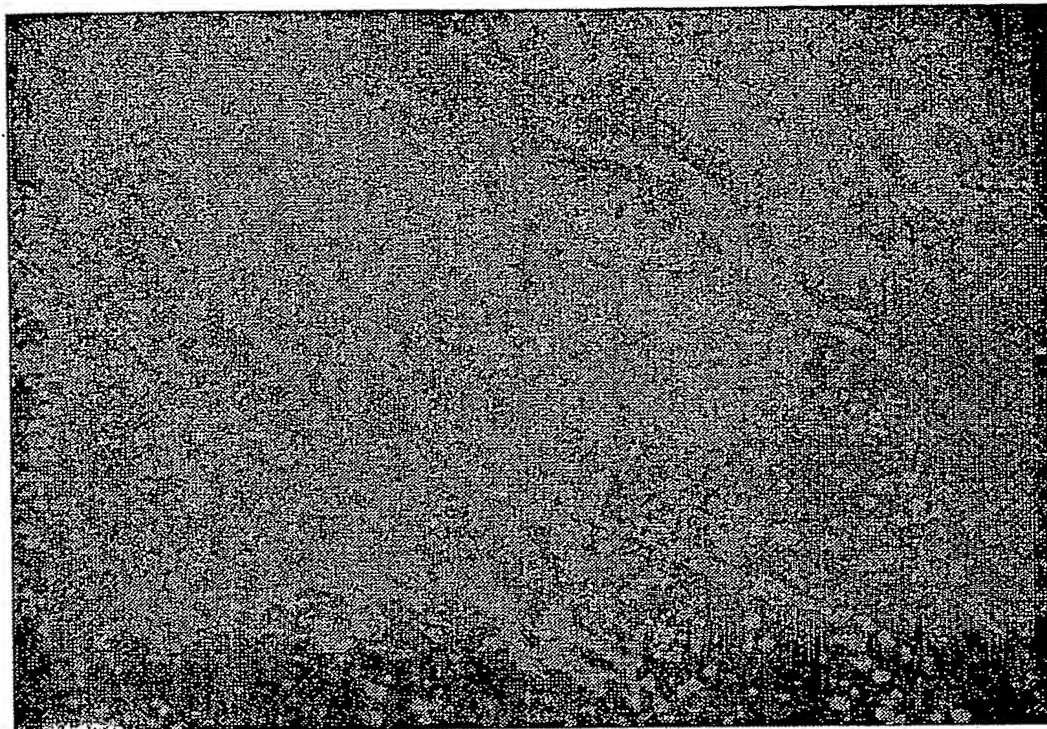
【図5】



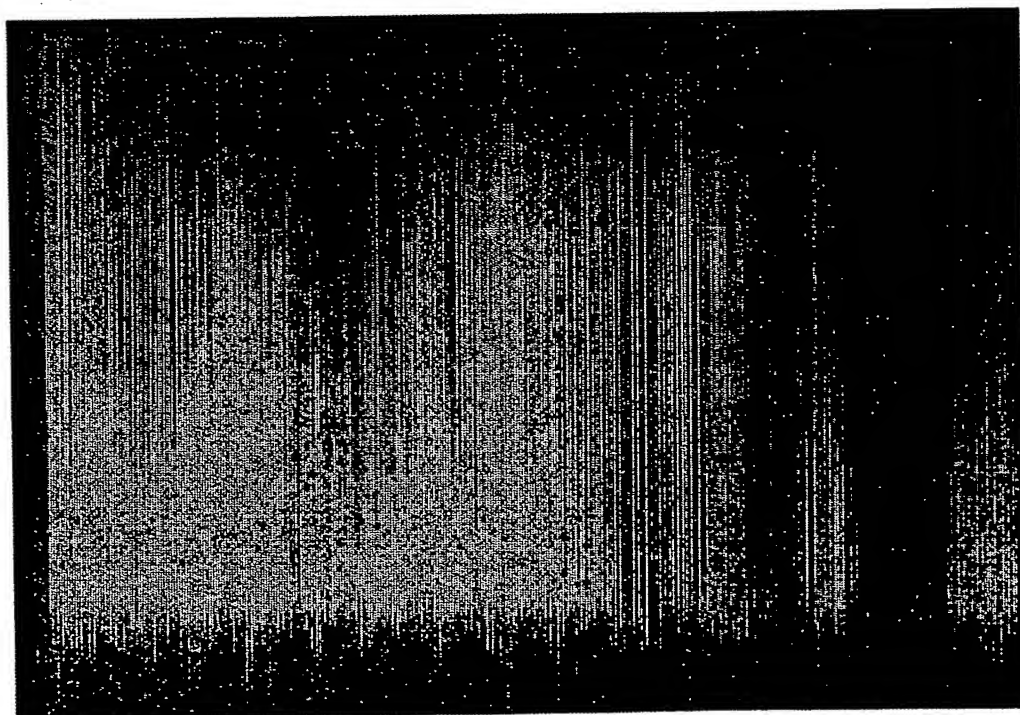
【図6】



【図7】



【図8】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 タンパク質中空ナノ粒子を用いた目的の細胞や組織に特異的に作用する疾患治療用薬剤であって、粒子内部にタンパク質薬剤を効率よく包含させることができる薬剤、およびこの薬剤を用いた治療方法を提供する。

【解決手段】 肝細胞などの特定の細胞に対する認識能を有し、粒子形成能を有するタンパク質（たとえば、B型肝炎ウイルス表面抗原タンパク質）からなる中空ナノ粒子において、当該タンパク質に疾患治療用の細胞導入物質（たとえばインターフェロンまたは肝細胞成長因子など）が融合されてなる薬剤である。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[396020800]

1. 変更年月日	1998年 2月24日
[変更理由]	名称変更
住 所	埼玉県川口市本町4丁目1番8号
氏 名	科学技術振興事業団